

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra experimentální biologie rostlin**



**Signální mechanismy regulace rozvoje postranních kořenů  
v odpovědi na dostupnost živin v prostředí**

Lateral root development in response to mineral nutrients; signal mechanisms and pathways.

**Bc. Daniela Halamková**

**Diplomová práce**

Praha, 2013

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2013

Podpis:

### ***Poděkování***

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za pomoc, cenné připomínky a postřehy při psaní mé diplomové práce. Ale také za její nesmírnou trpělivost, podporu a lidský přístup.

Za pomoc a cenné rady bych ráda poděkovala RNDr. Aleši Soukupovi, Ph.D.

Za pomoc při odběrech a technických potížích bych ráda poděkovala Ing. Yvettě Šefrnové a Mgr. Evě Husákové a dalším členům našeho týmu.

V neposlední řadě patří poděkování mé mamince za její nesmírnou trpělivost a psychickou podporu po celou dobu mého studia.

## Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Abstrakt	8
1. Úvod	10
2. Literární úvod	12
2.1. TTL	12
2.1.1. Struktura genů TTL	12
2.1.2. Lokalizace exprese jednotlivých členů genové rodiny TTL	14
2.1.3. Zapojení TTL genů v odpovědi rostliny na stres	15
2.2. Změny v morfologii kořenového systému v závislosti na dostupnosti fosforu v prostředí	18
2.2.1. Význam a dostupnost fosforu pro rostlinu	18
2.2.2. Morfologické změny kořenového systému v odpovědi na nedostatek fosforu	18
2.2.3. Terminace aktivity apikálního meristému	20
2.2.4. Vliv auxinu na uspořádání koř. systému při snížené dostupnosti fosfátu	22
2.2.5. Další regulační mechanismy, mutanti <i>lpi</i> a <i>prd</i>	23
2.3. Změny v morfologii koř. systému v závislosti na dostupnosti dusíku v prostředí	27
2.3.1. Význam a dostupnost dusíku pro rostlinu	27
2.3.2. Morfologické změny kořenového systému v odpovědi na dostupnost dusíku	27
2.3.2.1. Systémový efekt nedostatku dusíku	28
2.3.2.2. Systémový efekt nadbytku dusíku	28
2.3.2.3. Lokální efekt dostupnosti dusíku	30
2.3.3. Efekt dalších zdrojů dusíku na morfologii kořenového systému	32
2.3.3.1. Amonný kationt	32
2.3.3.2. Aminokyseliny	33
3. MATERIÁL A METODIKA	34
3.1. Rostlinný materiál	34
3.2. Sterilizace semen	34
3.3. Typy kultivací a kultivační podmínky	34



3.3.1.	Kultivační médium .....	34
3.3.2	Vodní kultury .....	35
3.3.2.1	Vodní kultura č. 1 (VK1).....	36
3.3.2.2.	Vodní kultura č. 2 (VK2).....	37
3.3.2.3.	Vodní kultura č. 3 (VK3).....	38
3.3.3.	Kultivace in vitro .....	38
3.3.3.1	Experiment in vitro č. 1 (IV1) .....	39
3.4	Zpracování kořenového systému.....	39
3.4.1.	Odběr a stanovení aktivity $\beta$ -glukuronidázy .....	39
3.4.2.	Analýza obrazu .....	40
3.4.3.	Příprava mikroskopických preparátů .....	42
3.5.	Statistické zpracování výsledků .....	43
4.	Výsledky.....	44
4.1.	VK1 .....	44
4.2.	VK2 .....	45
4.2.1.	První odběr.....	45
4.2.1.1.	Architektura kořenového systému.....	45
4.2.1.2	Analýza aktivity promotoru.....	48
4.2.1.3.	Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotami analýzy exprese GUS .....	49
4.2.1.4.	Analýza aktivity promotoru na mikroskopické úrovni.....	49
4.2.2.	Druhý odběr .....	58
4.2.2.1.	Architektura kořenového systému.....	58
4.2.2.2.	Analýza aktivity promotoru.....	60
4.2.2.3.	Analýza aktivity promotoru na mikroskopické úrovni.....	61
4.3.	VK3 .....	67
4.3.1.	První odběr.....	67
4.3.1.1.	Architektura kořenového systému .....	67
4.3.1.2	Analýza aktivity promotoru.....	69
4.3.1.3	Korelace mezi celkovou délkou koř. systému a aktivitou promotoru .....	70

4.3.2.	Druhý odběr .....	71
4.3.2.1.	Analýza nadzemní části rostlin.....	71
4.3.2.2.	Architektura kořenového systému.....	73
4.3.2.3.	Analýza aktivity promotoru.....	76
4.3.2.4.	Korelace mezi celkovou délkou koř. systému a hodnotami analýzy exprese GUS .....	78
4.3.2.5.	Analýza aktivity promotoru na mikroskopické úrovni.....	80
4.4.	Růst netransformovaných rostlin .....	89
4.4.1.	Analýza nadzemní části rostlin.....	89
4.4.2.	Architektura kořenového systému .....	90
4.5.	IV1 (kultivace <i>in vitro</i> č. 1).....	92
4.5.1.	Architektura kořenového systému.....	92
4.5.2.	Analýza aktivity promotoru.....	94
4.5.3.	Korelace mezi celkovou délkou koř. systému a hodnotami analýzy exprese GUS.....	96
4.5.4.	Mikroskopické pozorování.....	97
4.6.	Shrnutí výsledků.....	99
5.	Diskuze .....	102
5.1.	Růst rostlin .....	102
5.2.	Změny v morfologii kořenového systému .....	103
5.3.	Změny v růstu kořenů na mikroskopické úrovni .....	107
5.4.	Změny aktivity promotoru <i>TTL</i> genů v odpovědi na varianty výživy .....	112
5.4.1.	Aktivita promotoru <i>TTL4</i> .....	112
5.4.2.	Aktivita promotoru <i>TTL3</i> .....	115
5.4.3.	Aktivita promotoru <i>TTL1</i> .....	117
6.	Závěr.....	119
7.	Použitá literatura.....	121

## Seznam použitých zkratek

0,2x MS	MS médium zředěné na jednu pětinu
AA	kyselina askorbová
ABA	kyselina abscisová
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
GA	gibereliny
Glu	L-glutamát
GUS	$\beta$ -glukoronidáza
HK	hlavní kořen
HPM	medium s vysokou koncentrací fosfátu
IAA	kyselina indolyl-3,-octová
IV	in vitro (číslo za zkratkou uvádí pořadí dané kultivace)
JA	kyselina jasmonová
KR	kontrolní rostlina/y
LPM	medium s nízkou koncentrací fosfátu
N	dusík
P	fosfor
PK	postranní kořen
R/S	poměr biomasy podzemní části/nadzemní části rostliny (root/shoot)
TPR	tetratricopeptidové úseky
TRXL	thioredoxin-like motiv
VK	vodní kultura (číslo za zkratkou uvádí pořadí dané kultivace)

# Abstrakt

Při hledání genů podílejících se na vývoji postranních kořenů *Arabidopsis thaliana* byl na základě expresního vzorce identifikován gen *TTL3* patřící do genové rodiny *TTL* (*TETRATRICOPEPTIDE-REPEAT THIOREDOXIN-LIKE*). Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat změny aktivity promotoru genů *TTL1*, *TTL3* a *TTL4* v závislosti na vnějších podmínkách prostředí (dostupnosti dusíku a fosforu), které navozují změny v růstu kořenového systému a na základě nich popsat vztah mezi změnami aktivity promotoru genů *TTL*, rychlostí růstu kořenů a aktivitou apikálního meristému.

Rozdílná dostupnost klíčových makroprvků, dusíku a fosforu, podle očekávání navodila změny v růstu a morfologii kořenového systému. Rostliny trpící krátkodobě nedostatkem dusíku upřednostnily růst kořenového systému nad růstem nadzemní části, což se projevilo intenzivním růstem hlavního i postranních kořenů. U rostlin trpících krátkodobým nedostatkem fosforu došlo k postupnému zastavení růstu hlavního kořene i delších kořenů postranních. Dlouhodobý nedostatek fosforu nebo dusíku vedl v obou případech ke snížení rychlosti růstu kořenového systému oproti rostlinám kontrolním. N-deficientní rostliny rostly velmi podobně jako rostliny trpící nedostatkem fosforu.

Analýza aktivity promotorů s využitím reportérového genu pro  $\beta$ -glukuronidázu naznačila změny v intenzitě i lokalizaci aktivity závislosti na intenzitě růstu kořenů. Nejvýraznější vliv byl pozorován u promotoru genu *TTL4*, jehož aktivita rostla v pomalu rostoucích kořenech. Podobný trend byl zaznamenán i pro *TTL3* a *TTL1*, byl však méně výrazný. Pozorované změny v aktivitě promotorů zřejmě souvisí právě se změnami v intenzitě růstu či míře diferenciaci pletiv a sledované geny pravděpodobně nejsou zapojeny přímo do odpovědi rostlin na dostupnost dusíku nebo fosforu.

Pozorované změny v aktivitě genů *TTL* rodiny v závislosti na rychlosti růstu mohou naznačovat zapojení těchto genů do signálních drah ovlivňujících aktivitu apikálního meristému skrze některý z fytohormonů.

Klíčová slova: *TTL*, postranní kořeny, nitrát, fosfát, terminace aktivity apikálního meristému

# Abstract

*TTL3* gene was identified by forward screening of genes involved in lateral root development in *Arabidopsis thaliana* based on its expression pattern. *TTL3* belongs to the *TTL* (*TETRATRICOPEPTIDE-REPEAT THIOREDOXIN-LIKE*) gene family. The diploma thesis is aimed on characterisation of changes in *TTL1*, *TTL3* a *TTL4* promotor activities in response to external conditions (availability of nitrogen or phosphorus) that affect root growth. Obtained data should elucidate possible relation among *TTL* gene expression activities, root growth rate, and apical meristem activity.

Nitrogen or phosphorus deficiency triggered changes in root growth and root system morphology of experimental plants. Short-term nitrogen deficiency stimulated root growth. Short-term phosphorus deficiency induced gradual growth cessation in main root and long laterals. Long-term deficiency reduced root growth of both N-deficient and P-deficient plants compared to control. The root system size of N-deficient and P-deficient plant was almost similar.

Determination of promotor activity using  $\beta$ -glucuronidase reporter gene showed changes in expression activity and its localization in response to root growth intensity. *TTL4* gene promotor activity was the most responsive. Its activity was generally higher in slowly growing roots, particularly under phosphorus deficiency. *TTL3* a *TTL1* showed similar trends, but less pronounced. Observed changes in promotor activities seem to correlate with growth rate intensity or extent of root tissue differentiation, rather than with direct response to nitrogen or phosphorus availability.

Changes of *TTL* promotor activities in response to root growth rate may indicate involvement of *TTL* genes in phytohormonal regulation of root meristem activity.

Key words: *TTL*, lateral roots, nitrate, phosphate, root apical meristem activity termination

# 1. Úvod

Rostliny musí, vzhledem ke své neschopnosti aktivně se pohybovat za zdrojem živin, velmi efektivně využívat své přirozené prostředí k zisku dostatečného množství vody a živin pro svůj přirozený vývoj. Velkou výhodou pro rostliny představuje jejich plasticita v růstu a vývoji, která jim umožňuje reagovat na informace a signály z prostředí v podobě změn ve vývoji jejich těla (viz shrnutí (Malamy, J. E. 2005)). Rozdílné podmínky prostředí, hlavně dostupnost některých živin, velmi ovlivňuje distribuci, délku a počet postranních kořenů (viz shrnutí (Malamy, Jocelyn E. and Ryan, Katherine S. 2001)). Tato plasticita vývoje kořenového systému umožňuje rostlinám optimalizovat využití heterogenního půdního prostředí. V posledních letech bylo publikováno mnoho odborných článků zabývajících se signálními mechanismy, které spouští změny ve vývoji postranních kořenů v rámci odpovědi na dostupnost živin v prostředí. Přestože někteří pravděpodobní členové signálních drah byli již popsáni, stále zůstávají některé články těchto drah neznámé.

Při hledání genů podílejících se na vývoji postranních kořenů *Arabidopsis thaliana* byl na základě expresního vzorce identifikován gen *TTL3* patřící do genové rodiny *TTL* (*TETRATRICOPEPTIDE-REPEAT THIOREDOXIN-LIKE*) (Sefrnova , Y. et al. 2011, Soukup, A. et al. 2012). Funkce genů *TTL* zatím není zcela jasná, z doposud publikovaných prací a také na základě strukturních uspořádání jednotlivých členů této genové rodiny byla vyslovena hypotéza, že mohou fungovat jako co-chaperony (Prasad, Bishun D. et al. 2010). Experimenty zaměřené na členy této genové rodiny se zatím zabývaly rolí genů *TTL* při osmotickém stresu (Lakhssassi, N. et al. 2012, Rosado, A. et al. 2006) a rolí genu *TTL3* při utváření listové žilnatiny (Ceserani, T. et al. 2009). Funkce genové rodiny *TTL* při vývoji postranních kořenů zůstává zatím opomíjena, ačkoliv čtyři ze tří genů této rodiny (*TTL1*, *TTL3* a *TTL4*) identifikovaných u *Arabidopsis thaliana* jsou mimo jiné aktivní v kořenovém systému (Lakhssassi, N. et al. 2012, Rosado, A. et al. 2006). Vzhledem ke specifickým změnám v lokalizaci aktivity promotoru těchto genů během růstu kořenového systému je však pravděpodobné i jejich specifické zapojení právě do procesu růstu a vývoje postranních kořenů (Hilgert Delgado A. 2011, Sefrnova , Y. et al. 2011, Soukup, A. et al. 2012).

Vývoj postranních kořenů je značně ovlivňován dostupností živin v půdě, lze se proto domnívat, že jednotlivé geny *TTL* mohou hrát roli v signálních drahách upravujících růst postranních kořenů v závislosti na koncentraci živin v substrátu. Cílem mé diplomové práce proto je zmapování aktivity promotoru jednotlivých genů *TTL* vzhledem k rozdílným

podmínkám vnějšího prostředí – konkrétně při nedostatku dusíku a fosforu. Dostupnost těchto dvou makroprvků výrazným způsobem ovlivňuje růst postranních kořenů i aktivitu apikálního meristému. Manipulací s jejich dostupností lze proto navodit dobře definované změny v růstu kořenového systému a sledovat, zda a jakým způsobem budou korelovat s lokalizací aktivity promotorů *TTL* genů. Pro experimenty budou využity transgenní rostliny *Arabidopsis* nesoucí promotorové fúze s reportérovým genem pro  $\beta$ -glukuronidázu (GUS). Rostliny budou kultivovány *in vitro* i ve vodní kultuře, která umožňuje i krátkodobou manipulaci se složením kultivačního media.

**Cíle práce:**

- Charakterizovat změny aktivity promotoru genů *TTL* rodiny v závislosti na vnějších podmínkách prostředí (dostupnosti dusíku a fosforu).
- Popsat vztah mezi změnami aktivity promotoru genů *TTL*, rychlosti růstu kořenů a aktivitou apikálního meristému.

## 2. Literární úvod

### 2.1. TTL

#### 2.1.1. Struktura genů TTL

Genová rodina *TTL* (*TETRATRICOPEPTIDE-REPEAT THIOREDOXIN-LIKE*) je skupina genů specifická pro suchozemské rostliny (Lakhssassi, N. et al. 2012, Rosado, A. et al. 2006).

Jednotlivé proteiny TTL rodiny obsahují šest/sedm tetratricopeptidových úseků (dále TPR = Tetratricopeptide Repeat), nacházejících se v sekvenci na specifických pozicích, a C terminální sekvenci vykazující sekvenčně podobnou strukturu k thioredoxinu. Tato homologní sekvence je označována jako tzv. thioredoxin-like motiv (TRXL) (Rosado, A. et al. 2006). Charakteristickým znakem TRXL je absence jednoho ze dvou cysteinových zbytků vyskytujících se ve všech thioredoxinech, kde zodpovídá za jejich redukční charakter (Ceserani, T. et al. 2009).

Primární strukturu TPR tvoří 34 aminokyselin vytvářejících několik opakujících se motivů (Hirano, T. et al. 1990, Sikorski, Robert S. et al. 1990). Ačkoliv existuje mnoho TPR úseků lišících se funkcí, většina z nich se shoduje v umístění několika aminokyselin např. glycin nebo alanin na pozici 8 a alanin na pozici 20 a 27, ostatní pozice spíše preferují jednotlivé třídy aminokyselin (malé, velké nebo aromatické) než jednotlivé aminokyselinové zbytky (D'Andrea, Luca D. and Regan, Lynne 2003).

TPR úseky se ve struktuře proteinu vyskytují většinou společně a to v počtu 3 -16 opakování, ačkoliv se mohou vyskytovat i samostatně (Blatch, G. L. and Lassle, M. 1999, D'Andrea, Luca D. and Regan, Lynne 2003). Sekundární struktura TPR byla poprvé popsána u Ser/Thr fosfatázy 5 (PP5), obsahující 3 TPR úseky. Každý z těchto úseků vykazoval uspořádání helix-smyčka-helix, přičemž sousední TPR úseky byly uspořádány paralelně. Tato organizace struktur vede k spirální struktuře skládající se z antiparalelně uspořádaných  $\alpha$ -helixů (Das, A. K. et al. 1998).

TPR patří mezi úseky umožňující interakci mezi proteiny. Proteiny obsahující TPR jsou zapojeny do celé řady buněčných funkcí, mimo jiné se podílejí např. na kontrole buněčného cyklu, transkripci a transportu proteinů. Mohou tvořit multiproteinové komplexy nebo fungují jako chaperony skládající jiné proteiny do jejich správné terciární struktury či jako co-chaperony (viz shrnutí (Blatch, G. L. and Lassle, M. 1999)). Příkladem mohou být co-

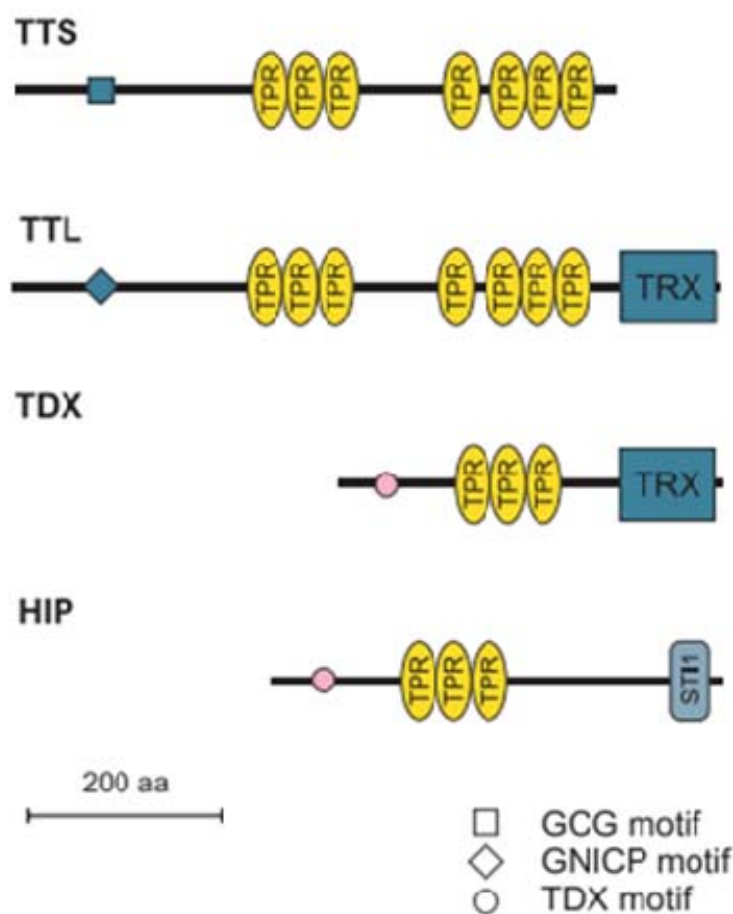


chaperony jednoho ze základních eukaryotických molekulárních chaperonů – Hsp90 – vykonávající svoji funkci s pomocí rozdílných co-chaperonů, které regulují jeho ATPázovou aktivitu a slouží k navázání klientských proteinů a jiných molekulárních chaperonů do komplexu s Hsp90.

Hned několik Hsp90 co-chaperonů obsahuje TPR doménu, která interaguje se specifickým motivem na C konci chaperonu Hsp90. Podjednotky TPR co-chaperonů vázajících se do komplexů s chaperonem Hsp90 se skládají z několika aminokyselin označovaných jako karboxylová svorka (carboxylate clam). Karboxylová svorka, která se váže mimojiné na C-konec chaperonu Hsp90, je součástí i TPR úseku v genech TTL. Proto se předpokládá, že proteiny TTL by mohly fungovat jako co-chaperony (Prasad, Bishun D. et al. 2010). Proteiny obsahující TPR hrají roli i v hormonální regulaci rostlin, jako je biosyntéza etylenu (Yoshida, Hitoshi et al. 2005) a odpovědích na cytokininy a GA (protein SPY) (Greenboim-Wainberg, Yaarit et al. 2005). Na základě uvedených informací lze předpokládat, že proteiny s TPR mohou být jednou z nepostradatelných součástí signálních drah vyvolaných rostlinnými hormony (Lakhssassi, N. et al. 2012).

Podle podobného uspořádání určitých domén v proteinech, lze určit tři skupiny proteinů příbuzné k proteinům rodiny TTL (obr. č. 2.1). Jedná se o HIP proteiny (HIP = heat shock interacting protein), TDX proteiny (TDX = thioredoxin-like disulfide reductase) a TTS proteiny (TTS = TTL Shortened). Proteiny TTS postrádají oproti TTL proteinům TRXL motiv. TDX

**Obr. č. 2.1:** Struktura proteinů rodiny TTS, TTL, TDX a HIP



proteiny mají oproti proteinům TTL méně TPR úseků, konkrétně tři opakující se TPR úseky. Stejný počet opakujících se TPR úseků nalezneme u HIP proteinů, které však postrádají TRXL motiv. V jejich struktuře však můžeme nalézt motiv STI1 (jedná se o Heat shock chaperonin vázající motiv). Konkrétní počet jednotlivých členů rodiny TTL a TTS se liší v závislosti na konkrétním druhu rostlin (Soukup, A. et al. 2012).

U *Arabidopsis thaliana* byli doposud identifikováni čtyři členové genové rodiny *TTL*. Konkrétně se jedná o geny: *TTL1*, *TTL2*, *TTL3*, *TTL4*. Z fylogenetických analýz vyplývá, že *TTL1* a *TTL2* patří do jiné vývojové skupiny než *TTL3* a *TTL4*. Všechny *TTL* geny však mají společného předka. Při zkoumání genových sekvencí jednotlivých genů *TTL* bylo zjištěno, že gen *TTL2* má z 62%, *TTL3* z 53% a *TTL4* z 50% shodnou sekvenci aminokyselin s *TTL1* (Rosado, A. et al. 2006). Jednotliví členové této genové rodiny vznikli zřejmě duplikací (Lakhssassi, N. et al. 2012). Častým společným znakem pro genovou subspecializaci je mutace v cis-regulačních oblastech promotorů. Rozdíly v nich pak často vedou k odlišným genovým expresím. Lakhssassi a kol. předpokládá, že na základě svých pozorování rozdílné exprese jednotlivých členů rodiny *TTL* v reakci na abiotický stres, by změny v cis-regulačních oblastech mohly být důvodem k subspecializaci uvnitř této genové rodiny (Lakhssassi, N. et al. 2012).

### **2.1.2. Lokalizace exprese jednotlivých členů genové rodiny TTL**

Jednotlivé geny patřící k této genové rodině mají sice velmi podobnou strukturu, ale liší se v tom, kde dochází k jejich expresi. S využitím transgenních rostlin nesoucích reportérový gen pro GUS byla u *Arabidopsis thaliana* pozorována aktivita promotoru *TTL1* především ve vyvíjejících se pletivech, než ve zralých pletivech a orgánech. Konkrétně byla pozorována exprese v elongační zóně kořenů, kořenové čepičce a ve stélé. Exprese tohoto genu byla pozorována i ve svěracích buňkách, žilnatině embrya, v úžlabních pupenech (Rosado, A. et al. 2006).

Exprese genu *TTL2* byla pozorována v tyčinkách a to konkrétně v pylových zrnech, ale také v mladých palistech. V hlavním kořeni ani v žádné fázi vývoje postranních kořenů nebyla exprese tohoto genu zaznamenána (Hilgert Delgado A. 2011, Lakhssassi, N. et al. 2012).

K expresi genu *TTL3* dochází v listové žilnatině, vodivých pletivech a hypokotylu (Hilgert Delgado A. 2011), svěracích buňkách a hydátodách (Ceserani, T. et al. 2009). Exprese *TTL3* se objevuje také v primordiích. V postranních kořenech byla exprese zaznamenána v apikálním meristému ale také v epidermis/primární kůře. V případě hlavního

kořene je exprese genu patrná nejen v distálním apikálním meristému ale i v oblastech výskytu primordií (Ceserani, T. et al. 2009, Hilgert Delgado A. 2011).

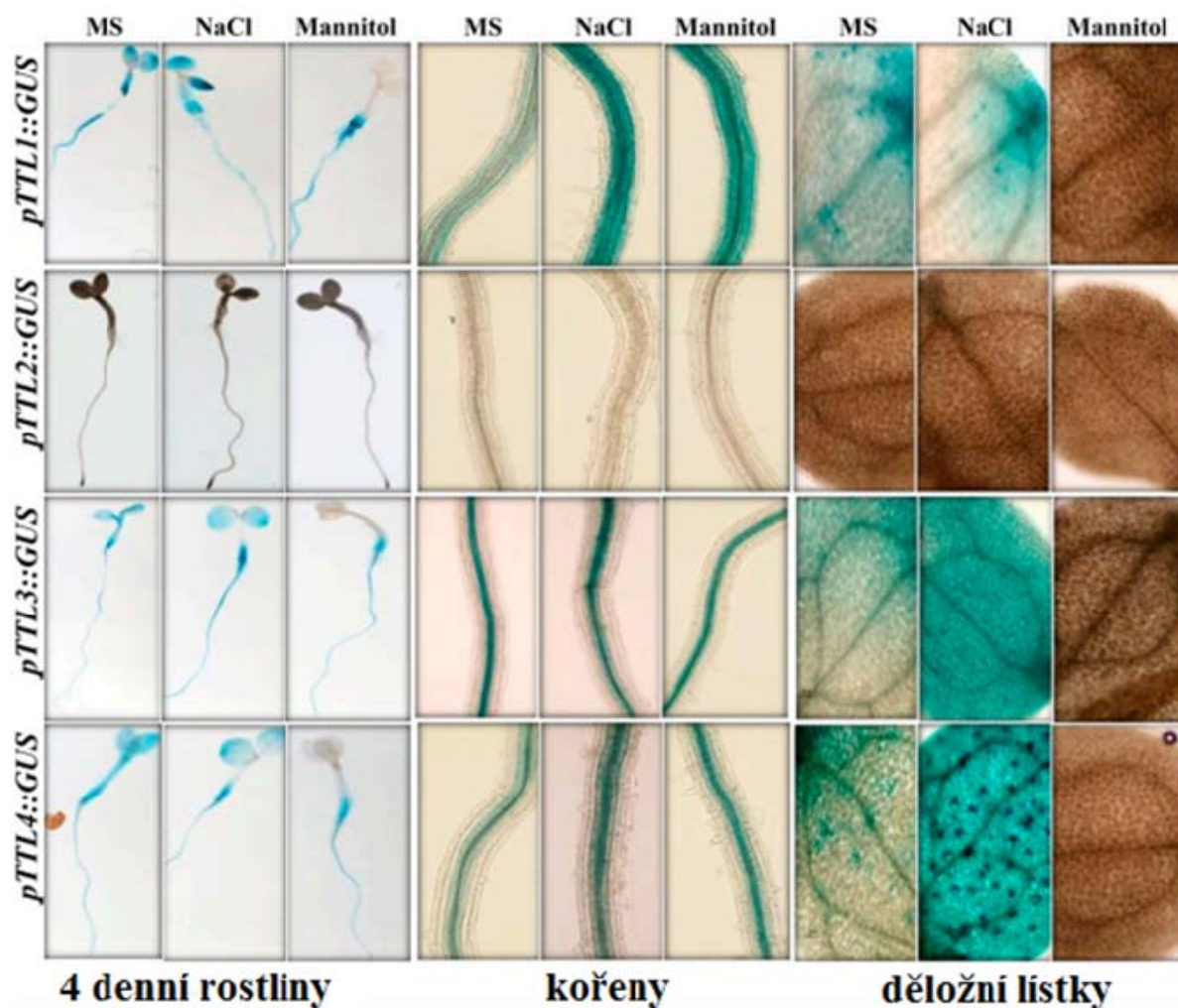
Expresí genu *TTL4* a *TTL3* byla popsána jako částečně se shodující, neboť i gen *TTL4* exprimuje v různých stádiích vývoje PK. Konkrétní lokalizace aktivity promotoru pro tento gen, se však na základě experimentů prováděných během mé diplomové práce liší (viz kapitola Výsledky). Během vývoje PK dochází ke změnám v samotné expresi promotoru pro gen *TTL4*. V případě delších postranních kořenů mizí exprese z oblasti bazálního meristému a přechodové zóny, zůstává však v iniciálních buňkách. V hlavním kořeni dochází k expresi v oblasti apikálního meristému. *TTL4* se také exprimuje v hydatodách, vyvíjejících se průduších a mezofylu listů (Hilgert Delgado A. 2011).

### **2.1.3. Zapojení TTL genů v odpovědi rostliny na stres**

Gen *TTL1* je pravděpodobně zapojen do reakce rostliny na osmotický stres a zvýšené množství NaCl. Rostlina mutantní v genu *TTL1* vykazuje sníženou toleranci vůči osmotickému stresu vyvolanému působením různých osmoticky aktivních látek (NaCl, KCl, manitol, sacharóza) v podobě redukce prodlužování kořene, zvýšené tvorby postranních kořenů, otoku kořenové špičky a dezorganizace v kořenovém meristému. V případě mutantních rostlin byl v elongační zóně pozorován stejný počet buněk jako u kontrolních rostlin, u rostlin mutantních však byly tyto buňky širší a nepravidelného tvaru. Z uvedených informací lze vyvodit, že gen *TTL1* se zřejmě účastní odpovědi na působení osmotického stresu (Rosado, A. et al. 2006). Klíčovým hormonem v regulaci odpovědi na osmotický stres je ABA (Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko and Shinozaki, Kazuo 2006). Proto se dalo předpokládat, že by *TTL1* mohl být zapojen do odpovědi rostliny na stres prostřednictvím tohoto hormonu. Expresní analýzy genů, kódujících enzymy biosyntézy a katabolismu ABA ukazují, že *TTL1* se zřejmě neúčastní regulace hladiny ABA v rostlině na úrovni její syntézy nebo degradace. *TTL1* však ovlivňuje expresi některých genů zapojených v odpovědi rostliny na dehydrataci (např. transkripčního faktoru DREB2A). Při zkoumání odpovědí rostlin defektních v genu *TTL1* na ošetření jinými hormony se došlo k závěru, že tento gen není zahrnut do odpovědi vyvolaných auxinem, cytokininem, brassinosteroidy či etylenem (Rosado, A. et al. 2006).

Lakhssassi a kol. (2012) došli k závěru, že i další členové genové rodiny *TTL* hrají specifickou roli v odpovědi rostlin na osmotický stres. Odpověď jednotlivých členů genové rodiny *TTL* se liší v případě stresu vyvolaného NaCl a stresu způsobeného jinými osmotickými látkami, například manitolem (obr. č. 2.2).

**Obr. č. 2.2:** Rozdíly v expresi jednotlivých genů *TTL* v odpovědi na stres vyvolaný NaCl a manitolem (Lakhssassi, N. et al. 2012)



Zatímco kořenový systém mutantů *ttl1*, *ttl3*, *ttl4* vykazuje zvýšenou citlivost vůči osmotickému stresu vyvolanému manitolem, tak zvýšenou toleranci vůči NaCl vykazuje pouze mutant *ttl4*. Rozdíly v odpovědích mutantu *ttl4* na stres vyvolaný NaCl a manitolem jsou patrné i na obrázku č. 1. Rostliny s nefunkčním genem *ttl4* navíc vykazovaly při 120mM koncentraci NaCl vyšší čerstvou váhu děloh a lepší růst kořenového systému oproti rostlinám majícím tento gen funkční. Aplikace NaCl vede ke stimulaci exprese genu *TTL1* v kořenech a v dělohách, zatímco manitol způsobuje zesílení exprese tohoto genu pouze v kořenech, v dělohách je naopak exprese potlačena. Geny *TTL3* a *TTL4* vykazují podobnou expresi, neboť manitol způsobuje jejich represi v dělohách (Lakhssassi, N. et al. 2012). Mutant *ttl2* nevykazoval pozměněnou odpověď vůči abiotickému stresu, naopak se choval jako rostliny s funkčním genem. U mutantu *ttl2* byla pozorována snížená plodnost způsobená poškozením samčího gametofytu. Lze předpokládat, že u genu *TTL2* došlo ke změně jeho původní

lokalizace, neboť z uvedených pozorování vyplývá, že gen *TTL2* hraje roli ve vývoji samčího gametofytu (Lakhssassi, N. et al. 2012).

Dvojíti mutanti (*ttl1/ttl3*, *ttl1/ttl4*, *ttl3/ttl4*) byli citlivější vůči osmoticky aktivním látkám než mutanti v jediném *TTL* genu. Největší senzitivitu pak vykazoval trojitý mutant *ttl1/ttl3/ttl4*. Tato narůstající citlivost naznačuje, že jednotlivé geny *TTL* jsou v odpovědi na osmotický stres částečně redundantní. Stejně jako u *ttl1*, i u dalších mutantů této genové rodiny (vyjma *ttl2*), je pozorovatelná disorganizace meristému v kořeni, která byla rozsáhlejší, čím více genů *TTL* bylo vyřazeno z funkce – nejvyššího stupně dosáhla u trojitého mutantu *ttl1/ttl3/ttl4*.

V případě trojitého mutantu *ttl1/ttl3/ttl4* byla pozorována snížená diferenciace vodivých pletiv, což naznačuje zapojení členů genové rodiny *TTL* ve vývoji vodivých elementů (Lakhssassi, N. et al. 2012). Tuto možnost potvrzuje práce Ceserani a kol. (2009) z které vyplývá, že gen *TTL3* (označovaný také jako *VIT*) funguje jako partner receptor-like kinasy VH1/BRL2 z rodiny BRI1 (BRI = brassinosteroid insensitive) při přenosu signálu. Protein VH1/BRL2 je spojován s degradací proteinů, vezikulárním transportem a přenosem signálů. Bylo prokázáno, že ovlivňuje vývoj prokambia. A je zřejmě zapojen, spolu s genem *TTL3*, do vývoje vodivých pletiv. Tato hypotéza vyplývá z pokusů, při kterých byly u *vit* mutantu pozorovány nepravidelnosti a nespojitosti v tvorbě žilnatiny ve vyvíjejících se dělohách *Arabidopsis thaliana*. Ceserani a kol (2009) proto předpokládají existenci komplexu tvořeného proteiny VH1/BRL2, TTL3 a VIK (VIK = VH1 – interacting kinase, představuje další protein interagující s VH1/BRL2). Na základě pokusů s mutanty však vyplývá, že komplex VH1/BRL2-TTL3 hraje roli při formování cévních elementů, zatímco komplex VH1/BRL2 – VIK se uplatňuje v pozdější fázi diferenciace.

Mutanti *vit* a *vh1* byli dále vystaveni působení rostlinných hormonů. Při aplikaci auxinu a brassinosteroidů vykazovali odlišnou senzitivitu vůči těmto hormonům oproti kontrolním rostlinám, z čehož lze usuzovat možné zapojení genu VH1/BRL2 a *TTL3* do signálních drah uvedených hormonů. Zdá se, že VIK funguje jako pozitivní a TTL3 jako negativní přenašeč signálu obdrženého od VH1/BRL2 (Ceserani, T. et al. 2009).

## **2.2. Změny v morfologii kořenového systému v závislosti na dostupnosti fosforu v prostředí**

### **2.2.1. Význam a dostupnost fosforu pro rostlinu**

Fosfor (dále také P) představuje jednu z významných živin potřebnou pro správný vývoj nejen živočichů, ale také rostlin. Je nezbytný pro syntézu nukleových kyselin a fosfolipidů, které představují hlavní složku membrán. Účastní se přenosu energie a je důležitou součástí mnoha metabolických drah. Nelze opomenout ani jeho roli v přenosu signálu skrze možnost fosforylace a defosforylace (viz shrnutí (Yang, X. J. and Finnegan, P. M. 2010)).

Po dusíku představuje fosfor druhý nejvíce limitující makroprvek pro vývoj rostlin, které tento prvek přijímají ve formě fosfátu. V mnoha ekosystémech je však tato sloučenina pro rostliny velmi těžko dostupná. Tato situace je zapříčiněna schopností fosfátu tvořit nerozpustné komplexy s kationty hliníku a železa v případě kyselého prostředí, či kationty vápníku v případě zásaditých podmínek, tyto komplexy však rostliny nejsou schopné přijímat. Z těchto důvodů se koncentrace fosfátu dostupného pro rostliny pohybuje v půdě v rozmezí hodnot 1-10  $\mu\text{M}$  (viz shrnutí (Abel, S. et al. 2002)).

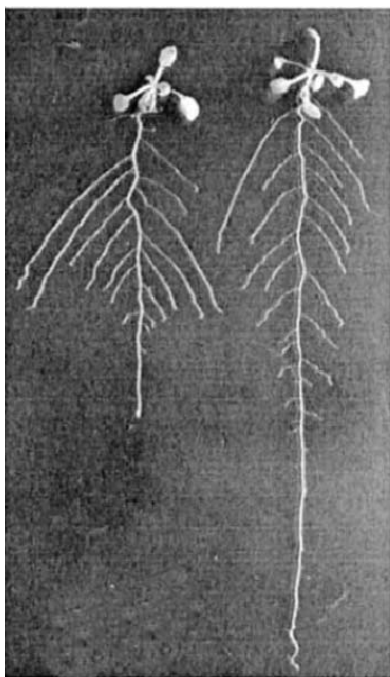
Aby rostliny předešly problémům vyplývajícím z nedostatečného příjmu fosforu, vyvinuly řadu rozdílných strategií. Mezi tyto mechanismy patří kromě modifikace kořenového systému, také mykorhiza, sekrece organických kyselin a fosfatáz kořeny rostliny či stimulace exprese genů pro vysokoafinitní fosfátové transportéry. Některé čeledi rostlin (např. *Proteaceae*, *Fabaceae*, *Casuarinaceae* a *Myricaceae*) pak tvoří specifické útvary, tzv. kartáčové kořeny (angl. cluster roots) (viz shrnutí (Peret, B. et al. 2011, Yang, X. J. and Finnegan, P. M. 2010)).

### **2.2.2. Morfologické změny kořenového systému v odpovědi na nedostatek fosforu**

Rostliny mění morfologii svého kořenového systému tak, aby došlo ke zvětšení celkového povrchu rhizosféry, kterým je fosfát absorbován a k redistribuci biomasy kořenového systému blíže k povrchu substrátu, kde se nachází fosfát obvykle ve větších koncentracích.

V případě *Arabidopsis thaliana* zůstává délka kořenového systému rostlin trpících nedostatkem P stejná jako u rostlin mající dostatečný příjem všech živin, rozdíl je však patrný

při podrobnějším zkoumání délky hlavního kořene a postranních kořenů (Al-Ghazi, Y. et al. 2003). Dochází k inhibici růstu hlavního kořene, zvýšené tvorbě a prodlužování postranních kořenů i kořenových vlásků (obr. č. 2.3) (Williamson, L. C. et al. 2001). Nízký obsah fosfátu také vede ke změně gravitropické odpovědi hlavního kořene, konkrétně k její redukci. Celková orientace kořenového systému rostlin vystavených prostředí s nízkým obsahem fosforu je spíše vertikální, což je způsobeno změnami v distribuci úhlů PK (Bai, H. W. et al. 2013). Ze zmíněných adaptací kořenového systému na snížený obsah fosfátu v půdě je patrné, že dochází k upřednostnění růstu PK před růstem hlavního kořene (Williamson, L. C. et al. 2001). Williamson a spol. (2001) se zaměřili i na další charakteristiky kořenového systému v závislosti na dostupnosti fosfátu. Pozorovali, že se zvyšující se dostupností fosfátu dochází k zakládání prvních PK dále od špičky hlavního kořene a prodlužování vzdálenosti mezi postranními kořeny.



**Obr. č. 2.3:** Celkový efekt redistribuce růstu mezi hlavním kořenem a kořeny postranními. Vlevo rostlina pěstovaná při 0,1 mM koncentraci fosfátu, vpravo při 2,5 mM koncentraci fosfátu (Williamson, L. C. et al. 2001).

Výše zmíněná odpověď kořenového systému na nedostatek fosforu však zřejmě není univerzální. Na základě experimentů provedených na 73 ekotypech *Arabidopsis thaliana* lze předpokládat, že redukce růstu hlavního kořene není pouze výsledkem drah spuštěných na základě dostupnosti fosfátu, nýbrž je i geneticky podmíněna, neboť polovina ze zmíněných 73 ekotypů vykazovala redukci hlavního kořene a čtvrtina vůbec nereagovala na různou dostupnost fosfátu (Chevalier, F. et al. 2003)

V případě některých jiných rostlinných druhů dokonce při nedostatku fosfátu v půdě pozorujeme naopak stimulaci růstu hlavního kořene. Tento jev lze pozorovat např. u kukuřice (Anghinoni, I. and Barber, S. A. 1980, Li, Z. X. et al. 2012), ovšem byly provedeny i experimenty, v nichž prodlužování hlavního kořene v daných podmínkách pozorováno nebylo (Mollier, A. and Pellerin, S. 1999).

V případě *Arabidopsis thaliana* bylo publikováno několik prací sledující vliv nízkého množství fosfátu na tvorbu a vývoj PK, jejich závěry však nejsou jednotné a to hlavně co se týče výsledků hodnotících hustotu/počet PK. Podle Al-Ghazi a kol. (2003) za daných podmínek dochází ke snížení počtu PK, kdežto Linkohr a kol. (Linkohr, B. I. et al. 2002)

neshledali změnu v počtu PK u rostlin trpících nedostatkem fosfátu a u kontrolních rostlin. Williamson a kol. (2001) a Lopez-Bucio a kol. (Lopez-Bucio, J. et al. 2002) naopak dokumentují zvýšení počtu PK. Kromě uspořádání samotných experimentů hraje důležitou roli i to, že reakce kořenového systému na nedostatek fosfátu v médiu vykazuje dvě fáze. V první fázi, která nastává 7. až 11. den po vyklíčení, dochází k prodlužování PK a jejich zvýšené produkci oproti rostlinám mající dostatečný příjem P. V druhé fázi nastávající po 11 dnech jsou růstové parametry negativně ovlivněny. Dochází nejen k inhibici růstu hlavního kořene, ale i postranních kořenů. Ve srovnání s rostlinami pěstovanými v médiu obsahující fosfor v 1 mM koncentraci, rostliny trpící sníženým obsahem fosforu v médiu (3  $\mu$ M P) vykazují i nižší počet PK. Výsledkem je celkově menší kořenový systém. Právě existence těchto dvou fází může mimo jiné vést k rozdílu mezi publikovanými pracemi, neboť záleží na stáří rostlin, u kterých byly růstové parametry analyzovány (Nacry, P. et al. 2005).

U rostlin trpících nedostatkem P bylo pozorováno až dvojnásobně rychlejší prodlužování PK oproti rostlinám, které měly dostatečný příjem fosfátu (Al-Ghazi, Y. et al. 2003).

U kukuřice (*Zea mays*) nedostatek fosfátu vede k inhibici tvorby postranních kořenů (Li, Z. X. et al. 2012).

### **2.2.3. Terminace aktivity apikálního meristému**

Při bližším zkoumání příčin inhibice růstu hlavního kořene v závislosti na snížené dostupnosti fosforu bylo zjištěno, že inhibice růstu hlavního kořene souvisí s vymizením aktivity apikálního meristému. Tento děj je charakterizován nejdříve redukcí prodlužování buněk s následnou ztrátou buněk meristematických. V konečné fázi dochází k zastavení proliferace buněk a k diferenciaci buněk i v místech, kde se dříve nacházela oblast meristému nebo elongační zóna (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005).

Snížená rychlost prodlužování osy hlavního kořene na mediu s nedostatkem fosforu (1  $\mu$ M) je u rostlin *Arabidopsis* patrná od 4. dne růstu, u rostlin starších deseti dnů je již růst hlavního kořene zcela zastaven (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005). Podílí se na tom pokles tvorby nových buněk apikálním meristémem i prodlužováním buněk v elongační zóně, neboť u rostlin rostoucích při nedostatku fosforu klesá délka epidermálních buněk i počet buněk v elongační zóně (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005).

Mitotická aktivita buněk apikálního meristému byla sledována pomocí markeru buněčného cyklu *CycB1;1:uidA*, který značí aktivně se dělící buňky. U rostlin trpících



nedostatkem fosforu se oblast aktivně dělících se buněk postupně zmenšovala a dvanáctý den po vyklíčení mitotická aktivita zcela vymizela (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005).

Na základě exprese markeru identity klidového centra (*QC46:GUS*) bylo dále zjištěno, že nízký obsah fosforu má vliv také na udržování identity klidového centra. U rostlin trpících nedostatkem fosforu bylo pozorováno opakované dělení buněk klidového centra, a to hlavně v prvních dvou dnech po vyklíčení. Od osmého dne již byl zaznamenán pokles dělicí aktivity, po deseti dnech růstu již nebyla pozorována žádná aktivita markeru klidového centra. Rostliny dostatečně zásobené fosforem vykazovaly typickou expresi markeru klidového centra ve 2 až 3 buňkách (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005).

U rostlin trpících nedostatkem P dochází k předčasné diferenciaci buněk kořene, což dokládá např. tvorba kořenových vlásků v menší vzdálenosti od špičky hlavního kořene nebo diferenciacie protoxylemu velmi blízko meristému hlavního kořenu ve srovnání s rostlinami vystavenými nadbytku P (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005).

Pokud dochází k dělení meristematických buněk pouze po omezenou dobu a následně tyto buňky podléhají diferenciaci, pak se tento proces označuje jako determinovaný vývoj (Barlow, P. W. 1976). Proto můžeme jako důvod zastavení růstu hlavního kořene v substrátu s nedostatečným množstvím P označit právě indukci terminace aktivity apikálního meristému (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005).

Indukce terminace aktivity apikálního meristému hlavního kořene je u *Arabidopsis* částečně vratná, záleží na délce vystavení kořenového systému nedostatku fosfátu. Sanchez-Calderon a kol. (2005) provedli pokus, kde pěstovali rostliny v médiu se níženým obsahem fosfátu (1  $\mu$ M koncentrace fosfátu) a následně je po 6, 7 nebo 8 dnech přenesli do prostředí se zvýšeným obsahem fosfátu (1mM koncentrace fosfátu). Šesti a sedmidenní rostliny přenesené do média se zvýšeným obsahem fosfátu byly schopny obnovit růst hlavního kořene. U osmidenních rostlin nebyl po přenosu do média s nadbytkem fosfátu pozorován žádný další růst hlavního kořene, ani proliferační aktivita v hlavním kořeni. Při bližším zkoumání délky postranních kořenů bylo zjištěno, že snížený růst hlavního kořene je kompenzován růstem především distálních PK (v blízkosti špičky hlavního kořene) a jen v menší míře PK proximálních (v blízkosti báze hlavního kořene). To zřejmě souvisí s faktem, že starší a delší PK také podléhají postupné terminaci aktivity apikálního meristému podobně jako hlavní kořen při nízkém obsahu fosfátu v médiu (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005).

#### 2.2.4. Vliv auxinu na uspořádání kořenového systému při snížené dostupnosti fosfátu

I když z počátku byla role auxinu v zapojení se do odpovědi rostlin na dostupnost fosfátu v podobě změn uspořádání kořenového systému vyloučena (Williamson, L. C. et al. 2001), objevuje se stále více důkazů svědčících o opaku.

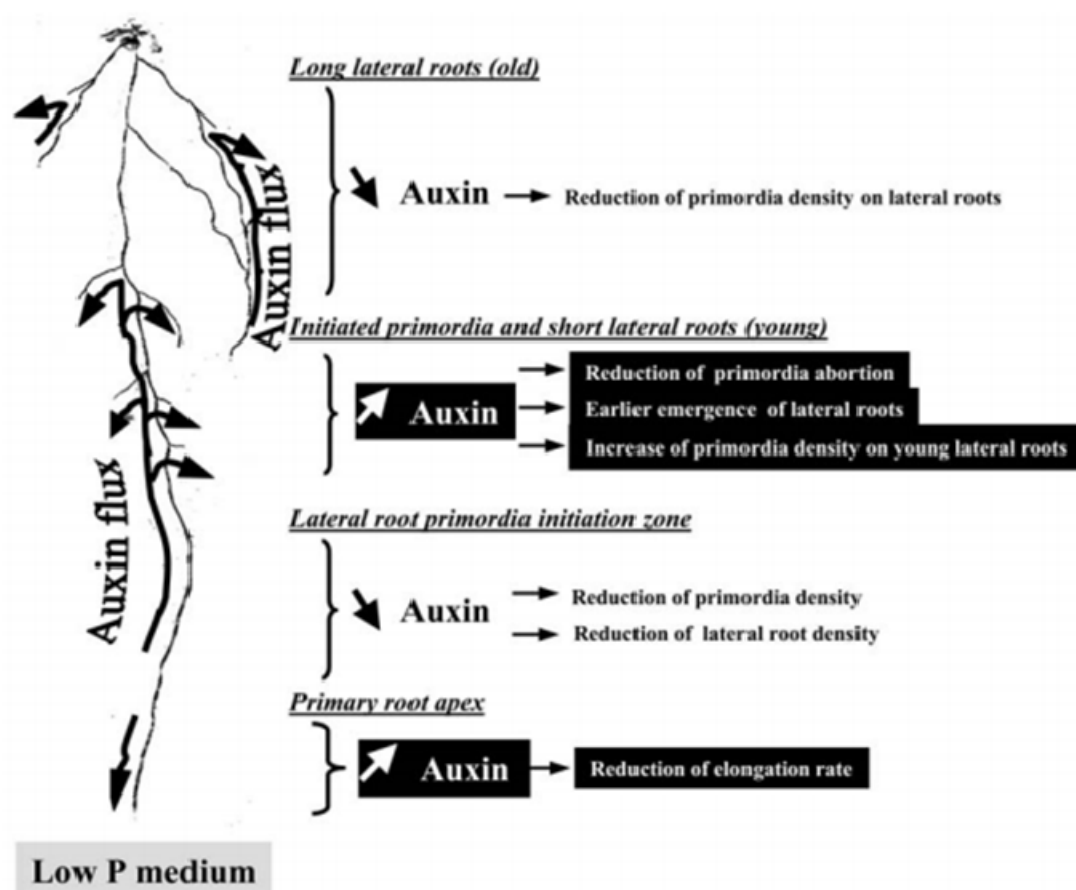
Auxin reguluje utváření kořenového systému na řadě úrovní, jeho transport a distribuce v kořeni je proto pečlivě regulována (Teale, W. D. et al. 2006). V hlavním kořeni u *Arabidopsis thaliana* je auxinové maximum lokalizováno v buňkách klidového centra, iniciálách kolumely a také v již diferencovaných buňkách kolumely (Sabatini, S. et al. 1999). Na základě experimentu s *pin* mutanty (proteiny PIN fungují jako přenašeče auxinu) bylo zjištěno, že auxin hraje roli hned v několika důležitých pochodech – má vliv na udržení aktivity kořenového meristému, dělení buněk a tedy ovlivňuje i celkový růst kořene (Blilou, Ikram et al. 2005). Auxin se dále podílí na formování PK (definování zakladatelských buněk primordia i aktivaci dělení buněk pericyklu v místě vzniku PK) i jejich růstu (viz shrnutí (Benkova, E. and Bielach, A. 2010)).

V odpovědi rostlin na nedostatek P se do souvislosti s auxinem se dává prodlužování PK i jejich dočasně zvýšené zakládání. U rostlin trpících nedostatkem fosfátu, dochází ke zvýšení citlivosti vůči tomuto rostlinnému hormonu (Al-Ghazi, Y. et al. 2003). Auxin reguluje různé fáze rostlinného vývoje a růstu skrze aktivaci/deaktivaci auxin-responsivních genů. Regulaci zprostředkovávají proteiny ARFs (auxin response factors), které fungují jako transkripční faktory. ARFs mohou být vázány na represory auxinové odpovědi - proteiny AUX/IAA. Degradace transkripčního represoru Aux/IAA probíhá pomocí proteolytického komplexu ubiquitinové ligasy SCF<sup>TIR1</sup>, jehož podjednotka TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) funguje u *Arabidopsis* jako receptor auxinu. U rostlin trpících nedostatkem fosforu dochází ke zvýšené expresi TIR v pericyklu hlavního kořene, což vede ke zvýšené degradaci represoru auxinové odpovědi (AUX/IAA), zvýšení citlivosti vůči auxinu a zvýšení tvorby PK (Perez-Torres, C. A. et al. 2008).

U rostlin trpících nedostatkem P také zřejmě dochází k redistribuci auxinu v rámci kořenového systému (obr. č. 2.4) (Nacry, P. et al. 2005). Nacry a kol. (2005) pozorovali hromadění auxinu v apikálním meristému kořene, v již vytvořených primordiích a mladých postranních kořenech, naopak nižší přítomnost auxinu oproti kontrolní rostlině se nacházela v oblasti hlavního kořene, kde dochází k zakládání PK a ve starších postranních kořenech (Nacry, P. et al. 2005).

Sánchez-Calderón a kol. (2005), částečně v rozporu s výše uvedenými pracemi, pozorovali u rostlin pěstovaných v médiu se sníženým obsahem fosforu postupné vymizení auxinového maxima ve špičce hlavního kořene.

**Obr. č. 2.4:** Schéma redistribuce auxinu v kořenovém systému rostliny trpící nedostatkem fosfátu (Nacry, P. et al. 2005)



### 2.2.5. Další regulační mechanismy, mutanti *lpi* a *prd*

Samotný apikální meristém je považován za tu část kořenového systému, která rozhoduje o rozsahu reakce rostliny na nedostatečný příjem P. Tento předpoklad byl podpořen několika experimenty. Pokud například dojde ke zvýšení aktivity apikálního meristému kořene přidavkem sacharózy, dojde zároveň i ke zvýšené odpovědi rostliny na nedostatek P v podobě zvýšené exprese *PSR* (phosphate starvation-responsive) genů, např. *MGD3* kódujícím monogalactosyl-diacylglycerol syntázu účastníci se syntézy galaktolipidů (Lai, F. et al. 2007). Odpověď na nedostatek fosfátu v podobě zastavení růstu hlavního kořene je také závislá na přímém kontaktu špičky hlavního kořene s médiem obsahujícím nízký obsah P (Svistonoff, S. et al. 2007).

Další podmínku představuje přítomnost železa (dále také Fe) v substrátu. Pokud se v médiu nachází železo ve velmi nízkém množství (10  $\mu$ M FeEDTA), pak uspořádání kořenového systému *Arabidopsis* nekoresponduje s množstvím P v médiu, to znamená, že při nízkém obsahu fosforu v médiu za současně nízkého obsahu Fe nedochází k zpomalení růstu hlavního kořene. Z toho lze usoudit, že inhibice růstu hlavního kořene v médiu s nízkým obsahem P může být způsobena toxicitou Fe (Ward, J. T. et al. 2008). Tato hypotéza však není dostatečně doložena a nevysvětluje např., proč nedochází nejen k zastavení růstu hlavního kořene ale i postranních kořenů (viz shrnutí (Peret, B. et al. 2011)).

Z hlediska rozpoznání mechanismu regulace aktivity apikálního meristému hlavního kořene a její terminace při nedostatku fosfátu se zdá zajímavý objev mutantů *lpi* (*low phosphorus insensitive*). Tyto mutanti nevykazují při nedostatku P výraznou redukci délky buněk ani snížení počtu buněk v hlavním kořeni, z čehož vyplývá, že zde nenastává terminace aktivity apikálního meristému. Existence těchto mutantů naznačuje, že vyčerpání meristému při nízké dostupnosti P není přímým důsledkem nedostatku P pro samotnou činnost meristému, ale spíše výsledkem regulačních drah zapojených v systémové odpovědi rostliny na nedostatek P (Sanchez-Calderon, L. et al. 2006).

Sanchez-Calderon a kol. (2006) se zaměřili na mutanty *lpi1* a *lpi2*. U obou mutantů nedochází k redukci délky buněk ani k poklesu počtu buněk v elongační zóně v hlavním kořeni, zůstává zachována meristematická aktivita. Oba mutanti tedy vykazují v médiu s nízkým obsahem fosforu prodlužování hlavního kořene, stejně jako rostliny kontrolní pěstované při zvýšené koncentraci fosforu. Při nízkém obsahu fosforu nebo síry rostliny tvoří PK ve zvýšeném množství. Mutanti *lpi1* se chovají při nedostatku P nebo S stejně, jejich hustota PK je vyšší než při růstu v kontrolním médiu, avšak nedosahuje hodnot rostlin kontrolních. Mutanti *lpi2* tvoří PK ve zvýšené množství jen při nedostatečném přísunu síry. Na základě tohoto zjištění lze předpokládat, že *LPI2* hraje důležitou roli při růstu hlavního kořene i tvorbě PK, zatímco *LPI1* je zapojen jen v růstu hlavního kořene. Mutanti neakumulují fosfor ve zvýšeném množství, proto se předpokládá, že udržení aktivity apikálního meristému je způsobeno spíše lokálními signály vyvolanými koncentrací fosforu v kořeni nebo v rhizosféře.

U *lpi* mutantů bylo navíc zjištěno, že vykazují sníženou indukci exprese genů zapojených do systému odpovědi rostliny na nedostatečný příjem P, konkrétně se jednalo o geny *PHOSPHATE TRANSPORTER 1 a 2*, *PURPLE ACID PHOSPHATASE 1*, *ACID PHOPHATASE 5* a *INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION 1*. Dá se tedy předpokládat, že existuje spojitost mezi determinovaným vývojem kořene vyvolaným nízkým obsahem P

v médiu a aktivitou genů zapojených do odpovědi rostliny na nedostatek P (Sanchez-Calderon, L. et al. 2006).

Pro zkoumání mechanismu terminace aktivity apikálního meristému při nedostatku P se zdá přínosný také výzkum mutantu *lpi4* (Chacón-López, Alejandra et al. 2011). Mutant *lpi4* je charakterizován nejdelším hlavním kořenem v rámci skupiny mutantů *lpi*. Při pokusech Chacón-López a kol. (2011) pěstovali *lpi4* a kontrolní rostliny původního genotypu v médiu s nízkým (5  $\mu$  M, LPM) nebo vysokým (1 mM, HPM) obsahem fosforu. Kontrolní rostliny i *lpi4* měly v HPM stejný kořenový fenotyp – dlouhý hlavní kořen s nízkým počtem postranních kořenů blízko báze hlavního kořene. Při nízkém obsahu fosforu měly kontrolní rostliny hlavní kořen krátký a PK formované hlavně blízko vrcholu hlavního kořene, zatímco u mutantů *lpi4* se fenotyp nezměnil. Mutanti *lpi4* rostoucí v HPM i LPM nevykazovali změny v uspořádání meristému ani předčasnou diferenciaci. Na základě porovnání exprese genů v kořenové špičce mutantu *lpi4* a kontrolních rostlin byly vytipovány geny, které by mohly hrát roli při terminaci aktivity apikálního meristému. Jednalo se o geny, u kterých došlo v případě mutantů *lpi4* ke zvýšení/snížení exprese oproti rostlinám kontrolním. U mutantu *lpi4* bylo zaznamenáno silné snížení exprese genů hrajících roli při syntéze a signalizaci jasmonátů a etylenu. Dále byly za možné kandidáty navození determinovaného vývoje označeny geny účastníci se odpovědí na oxidativní stres a regulace redoxního potenciálu.

U kontrolních rostlin pěstovaných při nízké koncentraci fosfátu byl pozorován pokles obsahu peroxidu vodíku, což koreluje s aktivitou peroxidáz u rostlin trpících nedostatkem fosforu. Při ošetření rostlin rostoucích v médiu se sníženým obsahem fosforu kyselinou askorbovou (= látka reagující s kyslíkovými radikály, AA = ascorbic acid) byl pozorován nárůst délky hlavního kořene a funkční apikální meristém. Ošetření rostlin látkou AA vede k obnovení její vnitřní koncentrace a nastolený redoxní potenciál vede k udržení buněčného dělení. Přímou či nepřímou cestou poté dochází ke zvýšení množství peroxidu vodíku v apikálním meristému kořene. Výsledkem je prodlužování kořene i při nedostatku fosforu. Přítomnost sníženého obsahu peroxidu vodíku může zřejmě s velkou pravděpodobností hrát roli při terminaci apikálního meristému (Chacón-López, Alejandra et al. 2011).

Aplikace kyseliny jasmonové (JA) způsobila redukci růstu hlavního kořene u kontrolních rostlin i *lpi4* rostoucích v HPM. U rostlin pěstovaných v LPM byla po přidání JA do média navozena redukce délky hlavního kořene i předčasná diferenciaci u *lpi4*. Na základě tohoto experimentu se zdá, že jasmonáty mohou být zapojeny do odpovědi kořenové špičky na nedostatek fosforu, vzhledem k tomu, že však JA nezpůsobila terminaci apikálního

meristému u mutantu ani u kontrolních rostlin pěstovaných v HPM, musí existovat další spolupodílející se faktory, např. působení etylenu (Chacón-López, Alejandra et al. 2011).

Mezi geny, které by mohly hrát roli při odpovědi kořenového systému na nedostatek fosfátu v půdě, patří také gen *PRD* (*PHOSPHATE ROOT DEVELOPMENT*). Gen *PRD* je součástí genové rodiny *AIL* (*AINTEGUMENTA – like*), ve které najdeme geny regulující vývoj meristému, např. *ANT* (*AINTEGUMENTA*) nebo *PLT1* (*PLETHORA1*). Kóduje transkripční faktor AP2/ERF. Exprese genu *PRD* je při nízkém obsahu P v půdě silně inhibována (Camacho-Cristobal, J. J. et al. 2008). *PRD* gen se specificky exprimuje ve špičce hlavního kořene i kořenů postranních. Nabízí se zde tedy spojitost mezi potlačením aktivity genu *PRD* a zastavením růstu hlavního kořene při nedostatečném příjmu fosfátu (Nole-Wilson, S. et al. 2005).

Na základě toho, že u mutantu *prd* při nízkém obsahu P v médiu pozorujeme výraznější redukci vývoje hlavního kořene a PK než u rostlin mající tento gen funkční, lze předpokládat, že gen *prd* je zahrnut do regulace růstu kořenového systému v odpovědi na nedostatek fosfátu v médiu kontrolou prodlužování hlavního kořene a PK. Nejeví se nicméně jako kontrolní bod pro spuštění signálů vyvolaných nedostatkem P v médiu, neboť u mutantu *prd* je exprese genů indukovaných právě nedostatkem fosfátu shodná s rostlinami s funkčním genem *PRD* (Camacho-Cristobal, J. J. et al. 2008).

Ticconi a kol. (2009) se v rámci svého výzkumu zaměřili na gen *PRD2*, jenž kóduje ATPázu typu P<sub>5</sub> (dříve označovaná jako MIA), jejíž specifita ani přesná role není známa. Mutanti *prd2* se vyznačují zvýšenou citlivostí kořenového meristému při nízké dostupnosti fosforu, která se ve fenotypu projeví výraznějším zkrácením délky hlavního kořene, než u rostlin kontrolních. U mutantu byla pozorována ztráta iniciál epidermálních buněk/ buněk primární kůry. P<sub>5</sub>-typ ATPázy je lokalizován v endoplasmatickém retikulu, je proto možné předpokládat, že gen *PDR2* ovlivňuje sekreční dráhy. Pomocí markerů pro endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát a plasmatickou membránu však bylo zjištěno, že lokalizace markerů Golgiho aparátu a plasmatické membrány jsou při snížené dostupnosti fosforu totožné u kontrolních rostlin i u *prd2* (při snížené dostupnosti fosforu). Marker endoplazmatického retikula však u *prd2* vykazoval nižší aktivitu. *PDR2* je zodpovědný za udržení funkčnosti jaderného proteinu SCR (SCARECROW) při nedostatku fosforu. Při nefunkčnosti proteinu SCR dochází k diferenciaci kmenových buněk a redukci meristému (Ticconi, Carla A. et al. 2009).

Expresa genu *PDR2* se v oblasti lokalizace klidového centra a v distálním meristému překrývá s expresí genu *LPR1* (*Low Phosphate Root 1*). *LPR1* kóduje určitý typ oxidázy, jenž

cílí do endoplasmatického retikula. Na základě překrývající se lokalizace exprese těchto dvou genů Ticconi a kol. (2009) předpokládají, že oba geny spolupracují na vytváření signálních drah v endoplasmatickém retikulu, které vedou k přizpůsobení aktivity meristému v závislosti na dostupnosti fosforu (Ticconi, Carla A. et al. 2009).

## **2.3. Změny v morfologii kořenového systému v závislosti na dostupnosti dusíku v prostředí**

### **2.3.1. Význam a dostupnost dusíku pro rostlinu**

Dostupnost dusíku (dále také N) představuje pro rostliny jeden z velmi limitujících faktorů v rámci jejich vývoje. Ačkoliv patří dusík mezi nejvíce dostupné prvky na zemi, v půdě je jeho dostupnost nízká. Navíc jedna z forem dusíku - nitrát - je v půdě velmi pohyblivá a může být snadno vyplavena. Její přítomnost je snižována i činností půdních denitrifikačních bakterií (viz shrnutí (Lopez-Bucio, J. et al. 2003)).

Rostliny mohou získat dusík v různé formě. Nejčastěji jej přijímají ve formě nitrátu ( $\text{NO}_3^-$ ) nebo amonného iontu ( $\text{NH}_4^+$ ), jsou však schopné asimilovat N i ve formě organických sloučenin, např. aminokyselin (viz shrnutí (Liu, Tzu Yin et al. 2009)).

Dusík není pro rostlinu pouze esenciálním makroprvkem, který je součástí proteinů, nukleových kyselin, koenzymů a různých sekundárních produktů rostlin, ale také signální molekulou, jejíž dostupnost ovlivňuje expresi mnoha genů zapojených do nejrůznějších procesů v rostlinném těle (Wang, Rongchen et al. 2003). Dostupnost nitrátu zpětnou vazbou ovlivňuje příjem a asimilaci prostřednictvím regulace aktivity nitrátových transportérů, nitrát reduktázy, atd. Dostupnost nitrátu reguluje i aktivitu genů účastnících se metabolismu uhlíku, čímž ovlivňuje i produkci organických kyselin potřebných při asimilaci anorganického dusíku do aminokyselin. Tato spolupráce mezi metabolismem dusíku a uhlíku je důležitá pro vývoj a růst rostlin (viz shrnutí (Miller, A. J. and Cramer, M. D. 2005, Vidal, Elena A. and Gutiérrez, Rodrigo A. 2008)).

### **2.3.2. Morfologické změny kořenového systému v odpovědi na dostupnost dusíku**

Rostliny vykazují schopnost modifikovat morfologii kořenového systému v odpovědi na dostupnost a lokalizaci dusíku v prostředí. To jim podobně jako v případě fosforu umožňuje efektivní příjem v heterogenních půdních podmínkách. V rámci této schopnosti můžeme

pozorovat několik typů odpovědí na dostupnost dusíku v půdě – systémové a lokální (Forde, B. G. 2002, Lopez-Bucio, J. et al. 2003, Roycewicz, Peter and Malamy, Jocelyn E. 2012).

#### **2.3.2.1. Systémový efekt nedostatku dusíku**

Rostliny strádající nedostatkem dusíku reagují posílením růstu kořenového systému na úkor růstu nadzemní části. Dochází ke stimulaci růstu hlavního i postranních kořenů a ke zvýšení poměru R/S. Tento efekt byl pozorován u více rostlinných druhů – *Zea mays* (Brouwer, R. 1962), *Gossypium hirsutum* (Raper, C. D. et al. 1977), *Glycine max* (Rufty, T. W. et al. 1984), *Plantago* (Freijssen, A. H. J. and Otten, H. 1984), *Nicotiana tabacum* (Paul, M. J. and Stitt, M. 1993, Scheible, W. R. et al. 1997) a *Arabidopsis thaliana* (Ikram, Sobia et al. 2012).

Pokud byly rostliny pěstovány v dělených kulturách (polovina kořenového systému v substrátu obsahujícím 5 mM koncentraci nitrátu, druhá v prostředí bez nitrátu), došlo v části obsahující  $\text{NO}_3^-$  ke stimulaci vývoje PK, v polovině postrádající nitrát naopak k represí. Pokud jsou rostliny zbaveny nadzemní části, schopnost systémové odpovědi ztrácí, ale odpověď na lokální výskyt  $\text{NO}_3^-$  zůstává zachována. Systémový efekt je tedy zřejmě řízen požadavkem nadzemní části na příjem nitrátu. Mutant *ipt3,5,7* (mutant pro ATP/ADP isopentenyl transferázu představující důležitý enzym pro biosyntézu cytokininu) vykazoval rozdílné odpovědi mezi kořenovým systémem vystaveným pouze vysoké koncentraci nitrátu a části kořenového systému v dělené kultuře, jenž byl v kontaktu s nitrátem. Tento ale i další výsledky představují důkaz, že cytokininy hrají roli v systémové odpovědi rostlin na přítomnost nitrátu v substrátu (Ruffel, S. et al. 2011).

#### **2.3.2.2. Systémový efekt nadbytku dusíku**

Nadbytek dusíku v prostředí růst kořenového systému naopak potlačuje. U rostlin *Arabidopsis thaliana* vystavených vysoké koncentraci nitrátu (> 10 mM) v celé délce svého kořenového systému byla zaznamenána inhibice prodlužování PK, především ve fázi těsně po jejich vyoření z mateřského kořene, jejich počet nebyl nikterak ovlivněn (Zhang, H. M. et al. 1999). Zhang a kol. (1999) během svých experimentů nepozorovali změnu v délce hlavního kořene, což je v kontrastu s výsledky experimentů Linkohr a kol. (2001), kteří pozorovali zkrácení délky hlavního kořene. Rozdíl ve výsledcích experimentů si vysvětlují rozdílným stářím rostlin, u nichž byly parametry měřeny. Zhang a kol. (1999) prováděli měření na 7 dní starých rostlinách, Linkohr a kol. (2001) na 14 a 18 denních rostlinách. Navíc pozorovali, že s narůstajícím stářím se rozdíly v délce zvětšovaly (Linkohr, B. I. et al. 2002).



Z pokusů prováděných na agarových plotnách rozdělených na tři části vyplývá, že inhibiční efekt vysoké koncentrace nitrátu je systémový, protože k inhibici dochází i v kompartmentu, který není vysoké koncentraci přímo vystaven (Zhang, H. M. and Forde, B. G. 1998).

Zastavení vývoje PK je navíc reverzibilní. Po přesunu rostlin z media s vysokým obsahem dusíku do media s jeho nízkou koncentrací dochází během 24 hodin k obnovení aktivity meristému postranních kořenů (Zhang, H. M. et al. 2007). Toto obnovení aktivity však může být jen přechodné (Remans, T. et al. 2006b).

Jako signál pro zastavení vývoje PK při nadbytku nitrátu se jeví samotný iont  $\text{NO}_3^-$  a jeho akumulace uvnitř rostliny, nikoliv koncentrace nitrátu v půdě či akumulace metabolitů nitrátu v rostlině. Tento závěr vyplývá ze zjištění, že u mutantu *nialnia2*, který nemá funkční nitrát reduktázu, došlo ke zvýšení inhibice vývoje PK v případě růstu v substrátu s vysokou koncentrací nitrátu (Zhang, H. M. et al. 1999, Zhang, H. M. et al. 2007).

Signální mechanismy zapojené v komunikaci nadzemní části s kořenovým systémem při odpovědi na vysokou dávku dusíku nejsou jednoznačně objasněné, předpokládá se účast např. aminokyselin, sacharózy, miRNA nebo auxinů a cytokininů (viz shrnutí (Forde, B. G. 2002, Roycewicz, Peter and Malamy, Jocelyn E. 2012, Walch-Liu, P. et al. 2006a)). Do systémové inhibice vývoje PK je zřejmě zapojena i kyselina abscisová (dále také ABA). Při pokusech s třemi mutanty nereagujícími na ABA (*abi4-1*, *abi4-2*, *abi5-1*) nebyla pozorována inhibice prodlužování PK v reakci na vysokou koncentraci  $\text{NO}_3^-$ . U čtyř mutantů defektních v syntéze tohoto hormonu (*aba1-1*, *aba2-3*, *aba2-4* a *aba3-2*) byla inhibice elongace PK částečně potlačena. Autoři těchto experimentů uvádějí, že jedním z mechanismů vysvětlujících tato pozorování je to, že nitrát zvyšuje syntézu kyseliny abscisové (Signora, L. et al. 2001).

Význam auxinu naznačují experimenty s přesunem rostlin *Arabidopsis* z media s vysokou koncentrací nitrátu (50 mM  $\text{KNO}_3$ ) do media s nízkým obsahem této sloučeniny. U těchto rostlin se nachází v kořenovém systému mnohem více auxinu než v nadzemní části, v porovnání s rostlinami trvale pěstovanými za vysoké koncentrace nitrátu v živném roztoku (Walch-Liu, P. et al. 2006a). Stejně výsledky byly získány i v experimentech se sojovými boby (Caba, J. M. et al. 2000). Na základě těchto experimentů lze předpokládat, že vysoká koncentrace nitrátu potlačuje biosyntézu auxinu nebo zabraňuje jeho transportu z nadzemní části do kořenů (Caba, J. M. et al. 2000).

Vzhledem k roli cytokininů v rámci růstu a vývoje rostlin, se zdá logické, že i tyto fytohormony budou hrát roli v signálních mechanismech vyvolaných zdroji dusíku. Rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované při vysoké koncentraci nitrátu (10 mM), obsahovaly mnohem

větší množství cytokininů než rostliny pěstované při nižší koncentraci (0,1 mM) (Kiba, T. et al. 2011). Cytokiny produkované v kořenech či do kořenů transportované z nadzemní části rostliny mohou představovat signál, že dusík je přítomen v dostatečném množství. Jedna z předpokládaných rolí cytokininů je jejich negativní ovlivňování genů zapojených do příjmu dusíku. Vnější aplikace cytokininů vede u *Arabidopsis thaliana* k represí některých genů, které kódují přenašeče amonného iontu, aminokyselin, močoviny a nitrátu. V případě nitrátu konkrétně dvou genů *NRT2.1* a *NRT2.3*. Úroveň aktivity těchto genů koreluje s transportní aktivitou nitrátu, proto lze předpokládat, že represe genů *NRT* způsobená cytokininy vede ke snížení příjmu nitrátu (Brenner, W. G. et al. 2005, Kiba, T. et al. 2005, Kiba, T. et al. 2011, Sakakibara, H. 2006, Yokoyama, A. et al. 2007).

V kořenech rostlin přesunutých z media obsahujícího 10 mM koncentraci nitrátu do media s 0,5 mM byla pozorována zvýšená akumulace vysokoafinitního přenašeče nitrátu *NRT2.1*. Mutanti *nrt2.1* po přesunu měly větší průměrnou délku PK, ale tvořily méně postranních kořenů než kontrolní rostliny. Při dostatečném zásobení nitrátem se však od sebe ve vývoji kořenového systému neliší. Lze tedy předpokládat, že klíčovým faktorem vedoucím ke změnám uspořádání kořenového systému je spíše příjem nitrátu než jeho koncentrace v substrátu. Vzhledem k tomu, že mutant *nrt2.1* je defektní v tvorbě primordií nezávisle na dostupnosti nitrátu, hraje gen *NRT2.1* roli i při formování PK (Remans, T. et al. 2006b).

#### **2.3.2.3. Lokální efekt dostupnosti dusíku**

U rostlin pěstovaných v relativním nedostatku dusíku vyvolává lokálně zvýšená dostupnost nitrátu stimulaci rozvoje PK v dané oblasti, což bylo opakovaně pozorováno u různých rostlinných druhů – *Arabidopsis thaliana* (Zhang, H. M. et al. 1999), *Hordeum vulgare* (Drew, M. C. 1975). Podobný stimulační efekt byl popsán také v případě amonného iontu – např. u *Arabidopsis thaliana* (Lima, J. E. et al. 2010) nebo *Hordeum vulgare* (Drew, M. C. et al. 1973). V případě *Arabidopsis* však existují i práce, které vliv amonného iontu nepotvrzují (Zhang, H. M. et al. 1999). Lokální aplikace glutaminu u *Arabidopsis thaliana* nestimulovala růst PK (Zhang, H. M. et al. 1999).

V případě nitrátu je u *Arabidopsis* výše popsáný lokální efekt spojen se stimulací prodloužování stávajících PK, které je u rostlin pěstovaných při 0,01 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  schopna vyvolat již koncentrace nitrátu 0,05 mM. Největší rozdíl v délce PK oproti kontrolním rostlinám je však zaznamenán v rozmezí koncentrace 0,1 – 10 mM (Zhang, H. M. and Forde, B. G. 1998). V případě *Hordeum vulgare* lokální aplikace dusíku vedla nejen k prodloužení PK, ale také ke zvýšení jejich počtu (Drew, M. C. et al. 1973). Zvýšení počtu PK bylo

pozorováno i v některých experimentech s *Arabidopsis thaliana* (Linkohr, B. I. et al. 2002), rozpory ve výsledcích mohou být pravděpodobně vysvětleny rozdílným stářím zkoumaných rostlin a uspořádáním experimentu (Linkohr, B. I. et al. 2002).

Prodlužování PK je způsobeno zvýšenou produkcí buněk meristémem, nikoliv větší délkou diferencovaných buněk (Zhang, H. M. et al. 1999). Lokální stimulační efekt je vyvolán zřejmě samotným iontem  $\text{NO}_3^-$ , protože mutanti defektní v nitrát reduktáze vykazovali stejný fenotyp jako rostliny kontrolní (Zhang, H. M. et al. 1999). Tuto domněnku potvrzuje také význam NRT1.1 v lokalizované odpovědi.

NRT1.1 (dříve označovaný také jako CHL1) je transportér nitrátu, jenž je lokalizován v mladých pletivech, především v kořenových špičkách (Guo, F. Q. et al. 2002). U rostlin s nefunkčním genem *NRT1.1* nedochází oproti kontrolním rostlinám k prodlužování PK uvnitř zóny se zvýšeným obsahem nitrátu ani ke zvýšené tvorbě postranních kořenů druhého řádu (Remans, T. et al. 2006a). Fenotyp *nrt1.1* mutantních rostlin není způsoben sníženým příjmem nitrátu ze substrátu a nelze jej potlačit přítomností jiného zdroje dusíku (Remans, T. et al. 2006a). Pravděpodobnou funkci transportéru NRT1.1 ve zmíněné signální dráze pomohlo odhalit zjištění, že u mutantů *nrt1.1* pěstovaných při nedostatku nitrátu dochází v oblasti s lokálně vyšší dostupností nitrátu ke hromadění auxinu ve špičkách postranních kořenů. Zároveň byla prokázána schopnost NRT1.1 transportovat kromě nitrátu také auxin (Krouk, G. et al. 2010). Na základě výše uvedených zjištění byl navržen pravděpodobný model účasti genu *NRT1.1* na kontrole vývoje PK v závislosti na lokálně zvýšené dostupnosti nitrátu. V rostlině pěstované při nedostatku nitrátu se přenašeč NRT1.1 podílí na bazipetálním transportu auxinu uvnitř postranních kořenů, což vede ke snížení koncentrace auxinu ve špičce PK a potlačení růstu. Vysoká koncentrace nitrátu inhibuje transport auxinu přenašečem NRT1.1, fytohormon se akumuluje ve špičce PK a stimuluje vývoj PK (Krouk, G. et al. 2010).

Zapojení auxinu do stimulace prodlužování PK v odpovědi na lokalizovanou dostupnost nitrátu potvrzují také další experimenty, např. absence této odpovědi u auxin-rezistentního mutantu *axr4* (Zhang, H. M. et al. 1999). Gen *AXR4* (*Auxin resistant 4*) je zapojen nejen do reakce rostlin na auxin, ale hraje také roli při formování postranních kořenů a gravitropické odpovědi kořenů (Hobbie, L. and Estelle, M. 1995), protože ovlivňuje lokalizaci auxinového přenašeče AUX1 (Dharmasiri, S. et al. 2006).

Dalším genem, u kterého byla v případě *Arabidopsis thaliana* popsána role v reakci postranních kořenů na lokální zdroj nitrátu je *ANR1*, který je členem MADS box rodiny transkripčních faktorů. Rostliny mající tento gen nefunkční nereagovaly na lokální zdroj

nitrátu zvýšenou elongací PK (Zhang, H. M. and Forde, B. G. 1998). *ANR1* je pozitivní regulátor růstu PK a při dostatečném příjmu dusíku rostlinou dochází ke snížení jeho exprese. Z pokusů prováděných Walch-Liu a kol. (2005) navíc vyplývá, že jedna nebo více složek regulační dráhy, jejíž součástí je *ANR1*, se nenachází ve špičce hlavního kořene.

Gen *ANR1* je součástí signální dráhy, v níž je zapojen i výše popsany transportér NRT1.1. Kromě toho, že oba zmíněné geny jsou aktivní ve stejných tkáních – špičce a bázi PK, primordiích a špičce hlavního kořene, potvrzuje tuto hypotézu i to, že u mutantu *nrt1.1* dochází ke snížení akumulace *ANR1* mRNA ve špičkách postranních kořenů rostoucích v oblasti se zvýšenou koncentrací nitrátu (Remans, T. et al. 2006a).

### 2.3.3. Efekt dalších zdrojů dusíku na morfologii kořenového systému

#### 2.3.3.1. Amonný kationt

Amonný kationt ( $\text{NH}_4^+$ ) představuje další významný zdroj dusíku, ačkoliv ve vysoké koncentraci může být pro některé rostliny toxický (viz shrnutí (Britto, D. T. and Kronzucker, H. J. 2002)). Rostliny pěstované v médiu obsahujícím jako zdroj dusíku pouze  $\text{NH}_4^+$  reagují na tyto podmínky různě v závislosti na rostlinném druhu i aplikované koncentraci  $\text{NH}_4^+$ . Např. rostliny *Arabidopsis* mají ve srovnání s rostlinami pěstovanými v médiu obsahujícím  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{NO}_3^-$  (10 mmol/l  $\text{NH}_4^+$ , 20 mmol/l  $\text{NO}_3^-$ ) kratší kořenový systém, což je způsobeno kratší délkou diferencovaných buněk a potlačením aktivity kořenového meristému vedoucí po několika dnech k zastavení dělivé aktivity (Li, Q. et al. 2010). Obecně platí, čím vyšší aplikovaná koncentrace  $\text{NH}_4^+$ , tím spíše je efekt negativní (Li, Q. et al. 2010).

Podobně jako v případě nitrátu stimuluje lokálně zvýšená koncentrace amonného iontu větvení kořene i prodlužování PK v dané oblasti kořene u ječmene (Drew, M. C. 1975) i *Arabidopsis* (Lima, J. E. et al. 2010). Pro navození lokalizované odpovědi je nezbytná přítomnost funkčního transportéru amonného iontu AMT1.3 (Lima, J. E. et al. 2010). I v tomto případě tedy hraje roli vnímání přítomnosti iontu v rhizosféře na úrovni jeho transportu do rostliny. Existují nicméně i práce, které tuto reakci nedokumentují. Např. Zhang a kol. (1999) pozorovali, že lokálně zvýšená koncentrace  $\text{NH}_4^+$  (1 mM) nevede, proti nitrátu, ke stimulaci prodlužování PK. Elongace postranních kořenů u *Arabidopsis thaliana* nebyla pozorována ani při nižší koncentraci  $\text{NH}_4^+$  (0,1 mM) lokálně aplikované ke kořenům (Zhang, H. M. et al. 1999). Lze to však přisoudit rozdílům v experimentálním uspořádání.

### 2.3.3.2. Aminokyseliny

Z aminokyselin, které představují organický zdroj dusíku, byl pozorován výrazný vliv na změny v morfologii kořenového systému *Arabidopsis thaliana* u glutamátu a tryptofanu. U ostatních aminokyselin nebyl žádný výrazný efekt pozorován (Forde, B. G. and Walch-Liu, P. 2009).

Tryptofan způsobil zkrácení hlavního kořene až o 25%. Tryptofan působí na morfologii kořenového systému podobně jako při ošetření rostliny auxinem (konkrétně IAA), což je v souladu s tím, že tryptofan je prekurzorem IAA (Celenza, J. L. et al. 1995, Evans, M. L. et al. 1994).

L -Glutamát (dále také Glu) způsobuje inhibici růstu hlavního kořene a zvýšenou tvorbu postranních kořenů v oblasti za špičkou hlavního kořene. U postranních kořenů, které dosáhly určité délky (přibližně 5-10 mm) dochází k zastavení jejich růstu (Walch-Liu, P. et al. 2006b). D-glutamát ani další sloučeniny složením podobné L-glutamátu, jako např. aspartát, glutamin či kyselina  $\gamma$ -aminomáselná nezpůsobily žádnou výraznou změnu ve vývoji kořenového systému.

Lze předpokládat, že na vrcholech kořenů se budou nacházet senzory, které budou detekovat přítomnost glutamátu v substrátu. Jako potenciální kandidát se jeví rodina genů *GLR* (Glu receptor-like gene), které jsou podobné savčím genům *iGluR* zapojeným do signalizace glutamátu při synapsích v centrálním nervovém systému či do intercelulární signalizace (viz shrnutí (Forde, B. G. and Walch-Liu, P. 2009) (Lam, H. M. et al. 1998, Moriyama, Y. and Yamamoto, A. 2004)).

Inhibiční efekt glutamátu lze potlačit přidáním nitrátu nikoli amonného iontu (Walch-Liu, P. and Forde, B. G. 2008). Lze tedy předpokládat, že efekt zmírňující inhibiční vliv glutamátu je vyvolán samotným nitrátem, nikoliv produkty metabolismu  $\text{NO}_3^-$ . Případná blokáda příjmu Glu zapříčiněná přítomností nitrátu nebyla potvrzena (Walch-Liu, P. and Forde, B. G. 2008).

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1. Rostlinný materiál

Jako experimentální materiál byly využívány transgenní rostliny, konkrétně *Arabidopsis thaliana* Col 0, *TTL::uidA* (GUS), které připravili RNDr. A. Soukup, Ph.D a Mgr. A.H. Delgado (Hilgert Delgado A. 2011, Soukup, A. et al. 2012). Tyto transgenní rostliny byly připraveny transkripční fúzí, kdy do genomu rostliny byl vnesen reportérový gen pro  $\beta$ -glukoronidázu (dále jen GUS) spolu s promotorem konkrétního genu *TTL*. Pro vnesení byla využita metoda floral dip, při kterém jsou květy *Arabidopsis thaliana* vystaveny působení média obsahujícího *Agrobacterium tumefaciens* nesoucím plasmid s fúzním konstruktem. Tento postup byl pro konkrétní geny *TTL* proveden opakovaně a byly tak získány nezávisle transformované linie pro dané *TTL* geny (Hilgert Delgado A. 2011, Sefrnova, Y. 1 et al. 2011, Soukup, A. et al. 2012). Pro experimenty v diplomové práci byly použity tyto linie: *TTL1::uidA* (GUS) 83 a 102, pro *TTL3::uidA* (GUS) linie 30 a 33 a pro *TTL4::uidA* (GUS) 40 a 43.

### 3.2. Sterilizace semen

Semena byla ošetřena dezinfekčním roztokem (20% chlornan sodný (SAVO) s 1% Triton X). Takto ošetřená semínka byla nejprve krátce protřepána, aby došlo k oddělení semínek od sebe a dezinfekční roztok se dostal ke všem semenům. Následně bylo dezinfekčním roztokem působeno po dobu 10-15 minut při laboratorní teplotě. Následovalo 3x propláchnutí destilovanou vodou. V poslední oplachové vodě byla semena ponechána a uložena na tři dny do lednice při teplotě 3°C, aby se synchronizovalo klíčení semen. U semen, která byla vysívána na agarové plotny, probíhala sterilizace i následný výsev za sterilních podmínek (ve flow-boxu).

### 3.3. Typy kultivací a kultivační podmínky

Rostliny byly kultivovány dvěma různými způsoby – *in vitro* na agarovém mediu a ve vodních kulturách.

#### 3.3.1. Kultivační médium

Při všech kultivacích bylo použito jako médium MS médium (Murashige, T. Skoog F. 1962), konkrétně jeho modifikované složení dle Sigma-Aldrich (medium MS basal salt

mixture - M5524; viz <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/tissue-culture-protocols/murashige-skoog.html>) zředěno na pětinovou koncentraci (dále označeno jako 0,2xMS). Médium bylo připravováno ze zásobních roztoků jednotlivých solí (tabulka č. 3.1) a jeho složení bylo v rámci jednotlivých experimentů upravováno pro varianty se sníženým obsahem P nebo N. Hladina K<sup>+</sup> byla ve všech variantách dorovnána na úroveň varianty kontrolní s pomocí KCl.

**Tabulka č. 3.1:** Složení 0,2x MS medium – obsah prvků a koncentrace jednotlivých sloučenin

<b>makroprvky</b>	<b>[mmol/l]</b>	<b>makroprvky</b>	<b>[mmol/l]</b>
N	11,64	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4,12
P	0,25	KNO <sub>3</sub>	3,76
Mg	0,30	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25
Ca	0,59	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,30
K	4,01	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,59
S	0,35		
<b>mikroprvky</b>	<b>[μmol/l]</b>	<b>mikroprvky</b>	<b>[μmol/l]</b>
Fe	20,00	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	20,05
B	20,05	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02
Co	0,02	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,02
Cu	0,02	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	20,02
Mn	22,38	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	20,00
Mo	0,21	MnSO <sub>4</sub> .xH <sub>2</sub> O	22,38
I	1,00	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,21
Zn	5,98	KI	1,00
Na	40,41	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,98

### 3.3.2 Vodní kultury

Semena byla kultivována v pětilitrových skleněných akváriích, jejichž stěny byly z venku polepeny černou neprůsvitnou fólií, která zabraňovala vstupu světla do kultivačního roztoku a ke kořenům rostlin (v případě experimentu VK1 a VK2) nebo byly ke kultivaci využity šedé plastové nádoby o objemu 12 litrů (experiment VK3).

Vzduchování bylo zajištěno akvarijním motorkem, od něhož vedly do každé nádoby hadičky. Aby unikající bublinky vzduchu nepoškodily kořenový systém rostlin, byly tyto hadičky zasunuty do větších plastových hadic, které byly zajištěny proti samovolnému pohybu.

Samotná semena byla seta na tenkou vrstvu čedičové vaty, která byla umístěna do horní části odstřižených špiček či plastových mikrozku mávek (Eppendorf) zasunutých do polyuretanové desky, plovoucí na vodní hladině. Velikost polyuretanových desek byla zvolena tak, aby desky zakrývaly veškerou plochu hladiny a zamezily tak vstupu světla ze shora.

**Tabulka č. 3.2:** Prvkové složení variant

prvky	kontrola (0,2xMS)	10μM KNO <sub>3</sub>	10μM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>makroprvky</b>	<b>[mmol/l]</b>	<b>[mmol/l]</b>	<b>[mmol/l]</b>
N	11,64	<b>0,01</b>	11,64
P	0,25	0,25	<b>0,01</b>
Mg	0,30	0,30	0,30
Ca	0,59	0,59	0,59
K	4,01	4,01	4,01
S	0,35	0,35	0,35
<b>mikroprvky</b>	<b>[μmol/l]</b>	<b>[μmol/l]</b>	<b>[μmol/l]</b>
Fe	20,00	20,00	20,00
B	20,05	20,05	20,05
Co	0,02	0,02	0,02
Cu	0,02	0,02	0,02
Mn	22,38	22,38	22,38
Mo	0,21	0,21	0,21
I	1,00	1,00	1,00
Zn	5,98	5,98	5,98
Na	40,41	40,41	40,41

polyuretanových desek byla zvolena tak, aby desky zakrývaly veškerou plochu hladiny a zamezily tak vstupu světla ze shora.

Rostliny byly kultivovány na světle v kultivační místnosti s konstantními podmínkami při teplotě 25 °C a fotoperiodě 16/8.

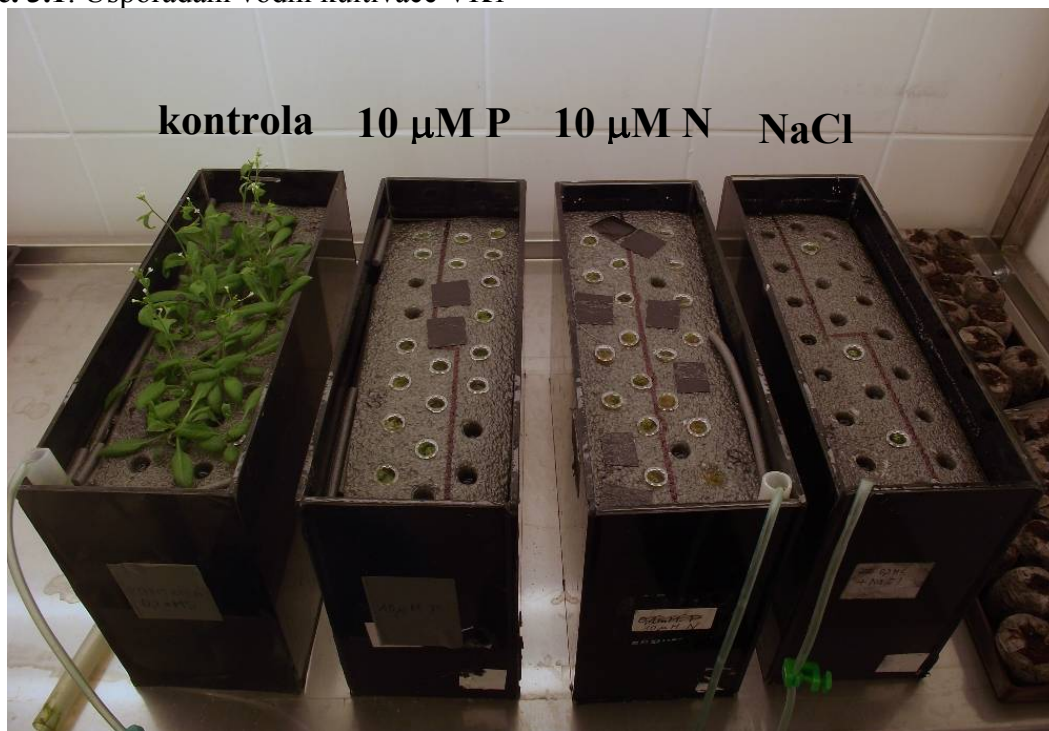
Byly provedeny celkem tři kultivace ve vodní kultuře, které se lišily experimentálním uspořádáním i variantami kultivačního roztoku.

### 3.3.2.1 Vodní kultura č. 1 (VK1)

Rostlinný materiál představovaly transgenní rostliny *TTL3::uidA* (GUS) – linie 30 a *TTL4::uidA* (GUS) - linie 43. Celkem byly vysety čtyři varianty: kontrolní varianta (složení odpovídalo 0,2xMS médiu), varianta se sníženým obsahem P (10μM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), varianta se sníženým obsahem N (10 μM KNO<sub>3</sub>) a varianta složením odpovídající 0,2xMS mediu s přidavkem 100mM NaCl (složení kultivačních roztoků – viz tabulka č. 3.2). Na každou variantu živného roztoku bylo vyseto 12 rostlin dané linie. Obě testované linie byly kultivovány ve společném akváriu. Experiment měl za cíl otestovat růst rostlin ve vodní kultuře v jednotlivých variantách výživy.



**Obr.č. 3.1:** Uspořádání vodní kultivace VK1

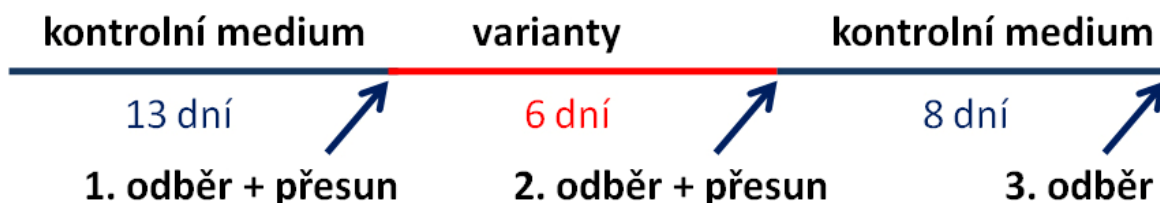


### 3.3.2.2. Vodní kultura č. 2 (VK2)

Při experimentu byly pěstovány dvě linie, *TTL3::uidA* (GUS) linie 30 a *TTL4::uidA* (GUS) linie 43. V tomto případě byly rostliny nejprve po určitou dobu pěstovány v kontrolním mediu a později přeneseny do jednotlivých variant (obr. č 3.2). Od každé linie bylo vyseto 48 rostlin do kontrolního média, jehož složení odpovídá 0,2xMS médiu (tabulka č. 3.1). V jednom akváriu bylo 24 rostlin – 12 rostlin *TTL3::uidA* (GUS) - linie 30 a 12 rostlin *TTL4::uidA* (GUS) - linie 43. Po 13 dnech byly z každého akvária a od každé linie odebrány dvě rostliny, zbytek rostlin byl přesunut do následujících variant: kontrolní varianta (odpovídající složení 0,2xMS médiu), 10 $\mu$ M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ M KNO<sub>3</sub>, 0,2xMS médium + 100 mM NaCl (složení roztoků je uvedeno v tabulce č. 3.2). Po dalších šesti dnech byl proveden odběr čtyř rostlin z každé varianty a všechny živné roztoky byly vyměněny za kontrolní médium. Po 8 dnech byly odebrány zbývající rostliny.

Všechny odebrané rostliny byly očištěny od čedičové vaty a dále zpracovány.

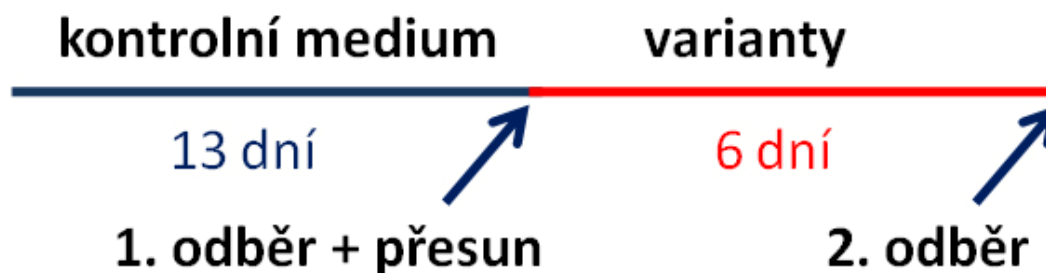
**Obr. č. 3.2:** Schéma uspořádání experimentu - VK2



### 3.3.2.3. Vodní kultura č. 3 (VK3)

V rámci tohoto experimentu bylo pěstováno šest linií: *TTL1::uidA* (GUS) linie 83 a 102, *TTL3::uidA* (GUS) linie 30 a 32 a *TTL4::uidA* (GUS) linie 43 a 40. Rostliny byly opět nejprve kultivovány v kontrolním médiu a následně přeneseny do jednotlivých variant (obr č. 3.3). Od každé linie bylo vyseto 60 rostlin do kontrolního média, které složením odpovídalo 0,2xMS médiu (tabulka č. 3.1). Rostliny byly pěstovány v šedých 12 l plastových nádobách. V každé nádobě bylo 40 rostlin – po 10 rostlinách od dané linie. Po třinácti dnech bylo od každé linie odebráno náhodně 6 rostlin. Zbylé rostliny byly přesunuty do následujících variant: kontrolní varianta (složením shodná s 0,2xMS médiem, tabulka č. 3.1), 10 μM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 10 μM  $\text{KNO}_3$  (složení uvedených variant – viz data v tabulce č. 3.2). Každá varianta dané linie rostlin byla zastoupena dvěma nádobami. Po šesti dnech růstu v různých variantách byly všechny rostliny odebrány, očištěny od čedičové vaty a dále zpracovány.

Obr. č. 3.3: Schéma uspořádání experimentu - VK3



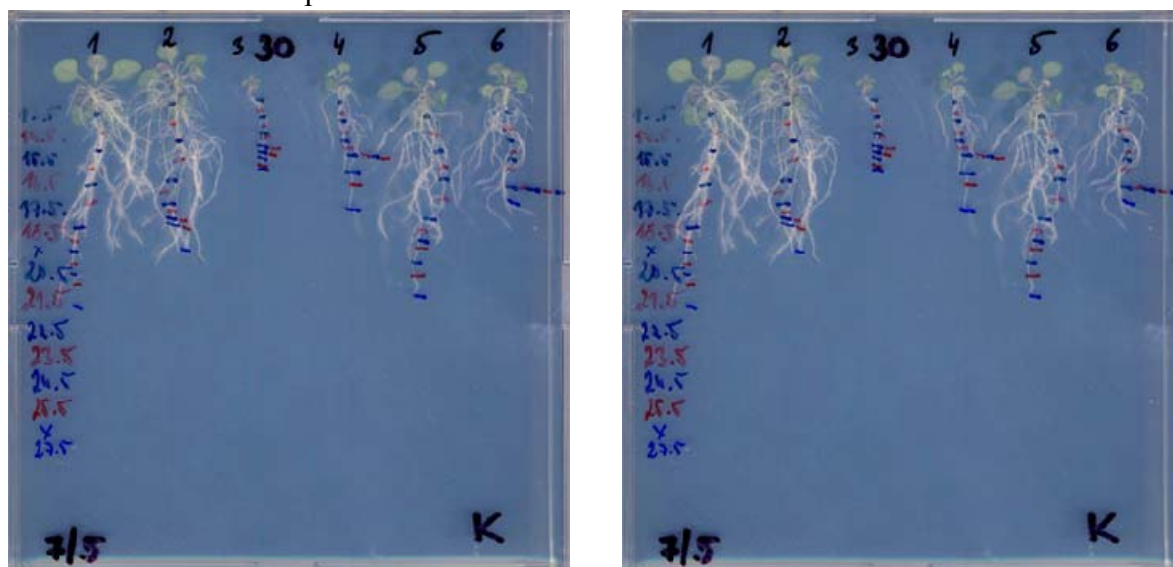
### 3.3.3. Kultivace in vitro

Sterilizovaná semena byla vyseta na agarové medium v hranatých Petriho miskách o velikosti 10x10 cm.

Jako kultivační médium bylo opět použito MS médium zředěné na jednu pětinu (viz tabulka č. 3.1), s výjimkou koncentrací sloučenin obsahující fosfor a dusík, jejichž hodnoty byly odstupňované podle konkrétní varianty (viz tabulka č. 3.2). Hladina  $\text{K}^+$  byla ve všech variantách dorovnána na úroveň varianty kontrolní s pomocí KCl. Všechny živiny byly v odpovídající koncentraci dávkovány do média ze zásobních roztoků jednotlivých solí. Kultivační médium dále obsahovalo 0,5% sacharózu a 2% agar. Připravené médium bylo sterilizováno (autokláv, 1 hod.), následně bylo nalito na Petriho misky ve flowboxu (aby byla minimalizována možnost kontaminace). Každá Petriho miska obsahovala 50 ml média. Do

každé misky bylo vyseto šest rostlin, následně byly Petriho misky po stranách zalepeny páskou Micropore 3M. Rostliny byly kultivovány na světle v kultivační místnosti při teplotě 21 °C a fotoperiodou 16/8. Rostliny byly odebrány po 20 dnech kultivace a dále zpracovány

**Obr. č. 3.4 :** Ukázka uspořádání kultivace in vitro IV1



### 3.3.3.1 Experiment in vitro č.1 (IV1)

Rostliny *TTL1::uidA* (GUS) linie 83, *TTL3::uidA* (GUS) linie 30 a *TTL4::uidA* (GUS), linie 43 byly pěstovány 20 dní na agarových plotnách lišících se v koncentracích dusičnanů a fosforečnanů. Kontrolní varianta odpovídala složení 0,2xMS media. Dále v tomto experimentu byly následující varianty: se sníženým obsahem dusíku (10μM N) a se sníženým obsahem fosforu (10μM P) – viz tabulka č. 3.2.

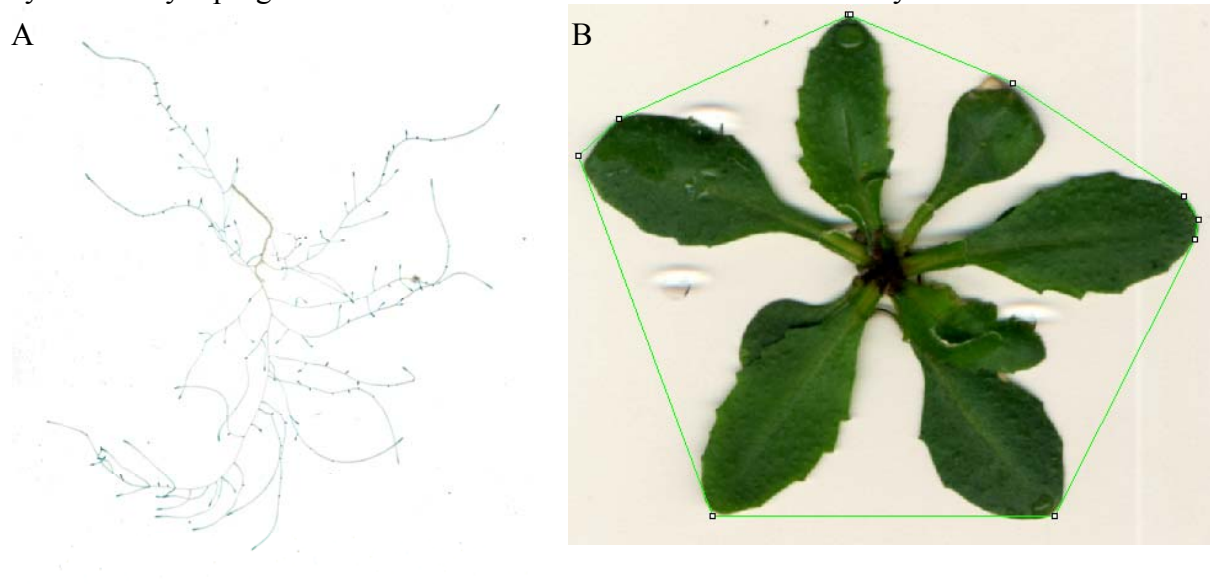
## 3.4 Zpracování kořenového systému

### 3.4.1. Odběr a stanovení aktivity β-glukuronidázy

V případě experimentu IV1 byly rostliny opatrně vyjmuty z agarových ploten, u experimentů VK1-3 se musel kořenový systém nejdříve vyprostit a očistit od čedičové vaty. Následně byla všem sklizeným rostlinám odstřižnuta nadzemní část a u kořenového systému byla provedena kvantitativní analýza aktivity β-glukuronidázy (GUS assay) - postup viz tabulka č. 3.3, složení použitých roztoků viz tabulka č. 3.4. Takto zpracovaný kořenový systém byl skenován v 65% roztoku glycerolu pomocí upraveného skeneru HP ScanJet 4c a programu NIS-Elements AR 3.1. Kořenové systémy rostlin ze všech experimentů byly

skenovány stejným způsobem – při pořizování obrázku byly v programu NIS-Elements AR 3.1 nastaveny následující parametry: 1600 dpi, 48-bit, positive film, typ dokumentu: film.

**Obr. č. 3.5:** A – Ukázka naskenovaného kořenového systému, B – Sken listové růžice vyhodnocený v programu NIS-Elements AR 3.2 - modulu Root Analyzer



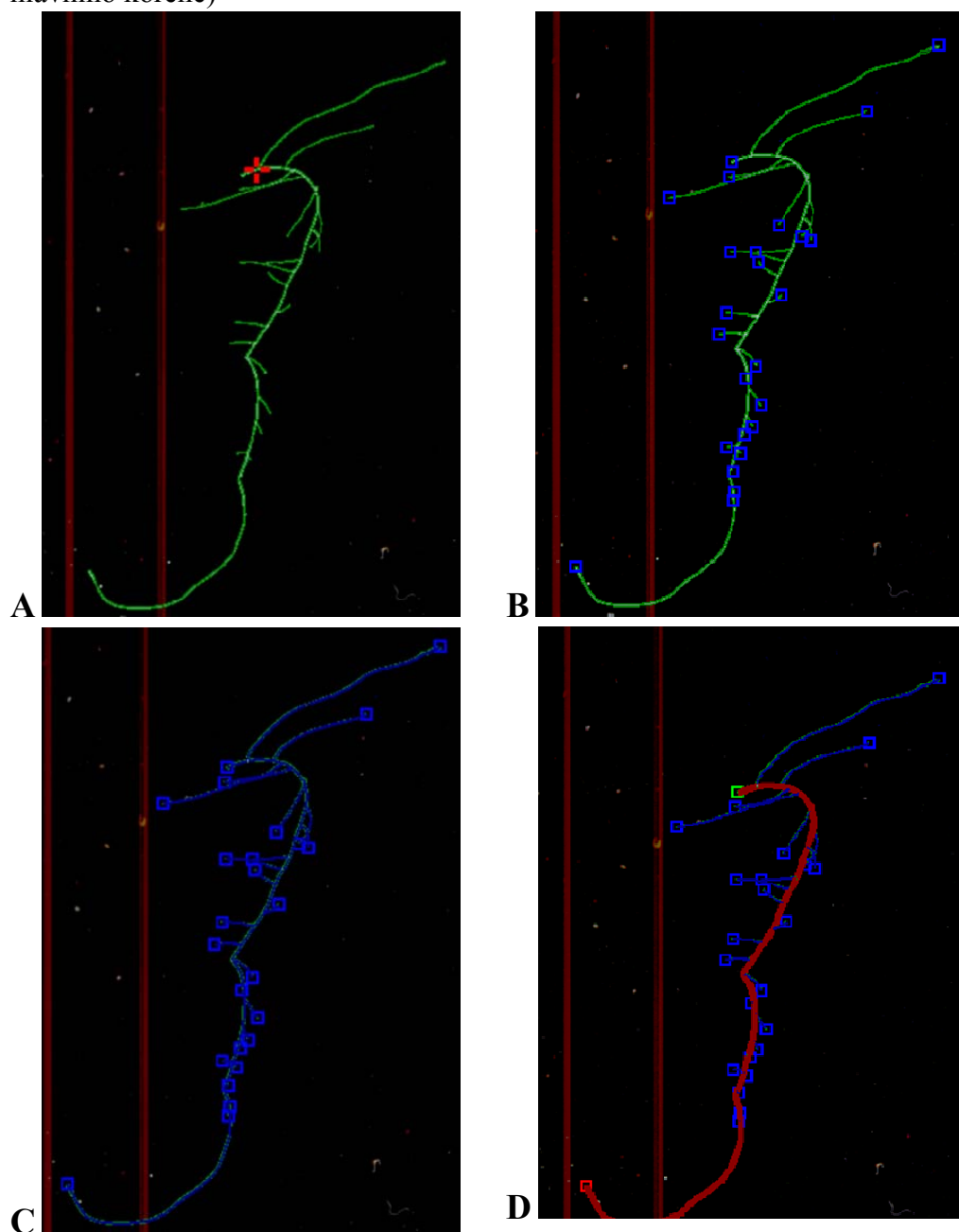
### 3.4.2. Analýza obrazu

Získané snímky kořenového systému byly využity pro stanovení morfologických parametrů kořenového systému (délka, větvení) a stanovení intenzity GUS aktivity. Pro obě stanovení byla použita metoda analýzy obrazu s využitím softwaru NIS-Elements AR 3.2. Pro analýzu morfologických parametrů modul Root Analyzer (obr. č. 3.6). Pro analýzu GUS aktivity měření plochy. Stejný program byl použit i k analýze GUS.

Všechny obrazy kořenového systému byly před samotnou analýzou kalibrovány (hodnota kalibrace: 1 pixel = 15,87  $\mu\text{m}$ ).

V případě obrazové analýzy kořenového systému byly z hodnot naměřených programem Root Analyzer vybrány následující data: celková délka kořenového systému, délka hlavní osy kořene, celková délka postranních kořenů, počet postranních kořenů I. a II. řádu. Vzhledem k tomu, že rostliny pěstované při snížené koncentraci dusíku nebo fosforu vykazují kořenový systém s vysokým počtem postranních kořenů, které pak díky překryvu při skenování nemohly být programem správně přiděleny do jednotlivých řádů PK, jsem dále pracovala jen s hodnotou celkového počtu PK, kterou jsem získala součtem údajů o počtu PK I. a II. řádu.

**Obr. č. 3.6:** Jednotlivé kroky analýzy kořenu prostřednictvím programu NIS-Elements AR 3.2 - modulu Root Analyzer (A – výběr kořenového systému, B – označení vrcholu hlavního kořene a PK, C – výběr os kořenů, D – označení hlavního kořene)



Pro analýzu rozsahu exprese GUS bylo provedeno měření plochy celého kořenového systému a plochy vykazující aktivitu GUS (přítomnost modré barvy). Prahování bylo v tomto případě nastaveno na základě intenzity modré komponenty obrazu a bylo pro všechny analyzované kořeny identické.

Byly zjišťovány následující údaje: binární plocha, ROI plocha, hodnota průměrné modré. Hodnota průměrné modré odráží intenzitu modré barvy, tedy míru exprese GUS

v dané oblasti. ROI plocha určuje procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene, jejíž hodnotě odpovídá hodnota binární plochy.

### 3.4.3. Příprava mikroskopických preparátů

Kořenové systémy rostlin pěstovaných byly po detekci aktivity GUS a skenování použity pro přípravu mikroskopických preparátů. Kořeny byly umístěny na mikroskopické sklíčko do projasňovacího roztoku (složení projasňovacího roztoku – tabulka č. 3.5), kde byly ponechány několik dní a následně pozorovány. Použit byl mikroskop Olympus BX50 využívající techniku DIC (Nomarski Differential Interference-Contrast). Obrázky sledovaných struktur byly pořízeny kamerou Apogee Alta U4000 CCD.

V období mezi skenováním kořenového systému a přípravou trvalých preparátů byly kořenové systémy uchovávány v 65% glycerolu.

Při mikroskopickém pozorování byla zaměřena pozornost na intenzitu exprese GUS a její lokalizaci v jednotlivých částech kořene. Lokalizace a intenzita exprese GUS byla sledována u následujících struktur kořenového systému: špička hlavního kořene, primordia, mladé krátké PK, starší dlouhé PK, PK II. řádu.

**Tabulka č. 3.3:** Postup GUS assay

čas	postup
30 min	fixace rostlin v 90% acetonu (vychlazeném na - 20°C)
	odsátí acetonu
15 min	promytí vychlazeným promývacím pufrem
1 hod	odvzdušnění kořenového systému pomocí vývěvy
5 hod	barvení barvicím roztokem
30 min	odsátí barvicího roztoku a nahrazení 2 ml 15% glycerolu s 2% DMSO
30 min	odsátí roztoku a nahrazení 2 ml 30% glycerolu s 2% DMSO
30 min	odsátí roztoku a nahrazení 2 ml 50% glycerolem s 0,1% tritonem
30 min	odsátí roztoku a nahrazení 65% glycerolem s 2% DMSO

**Tabulka č. 3.4:** Složení promývacího a barvicího pufru

promývací pufr (50 ml) - složení	V (ml)	barvicí pufr (20 ml) - složení	V (ml)
ferrokyanid (50 mM)	0,5	ferrokyanid (50 mM)	0,2
ferrikyanid (50 mM)	0,5	ferrikyanid (50 mM)	0,2
NaPO <sub>4</sub> (0,1 M), pH 7,0	49	NaPO <sub>4</sub> (0,1 M), pH 7,0	15
		30 mg X-gluc v 1,5 ml DMSO	0,125

**Tabulka č. 3.5:** Složení projasňovacího roztoku

Složky projasňovacího roztoku	množství jednotlivých složek
thiosíran sodný	0,04 g
65% glycerol	20 ml
jodid sodný	17 g
dimethylsulfoxid	0,4 ml

### 3.5. Statistické zpracování výsledků

Statistické vyhodnocení výsledku bylo zpracováno pomocí programu NCSS 2000 PASS 2000 (Jerry Hintze, Kaysville, Utah). V případě dat z experimentu VK2, IV1 a hodnot z prvního odběru VK3 byly rozdíly mezi variantami kultivace analyzovány pro každou rostlinnou linii pomocí analýzy rozptylu jednoduchého třídění (One-Way ANOVA) a Tukey-Kramer testu mnohonásobného srovnání pro zjištění, které hladiny faktoru se mezi sebou liší. Zároveň byla provedena analýza variance dvojitého třídění (Analysis of variance) pro zhodnocení vlivu varianty kultivace i rostlinné linie (a interakce těchto dvou faktorů) na variabilitu sledovaných parametrů. V případě experimentu VK3 byla každá varianta kultivace zastoupena dvěma samostatnými nádobami s identickými experimentálními podmínkami. Pro analýzu byla proto využita hierarchická analýza variance (Nested-GLM ANOVA) a Bonferroni Multiple Comparison test. Data byla ve všech případech před statistickou analýzou transformována přirozeným logaritmem.

Pro zjištění případných korelací mezi celkovou délkou kořenového systému a procentuálním zastoupením oblastí s detekovatelnou aktivitou GUS z celkové plochy kořene či hodnotou průměrné intenzity modré barvy byl využit Spearmanův korelační koeficient (Correlation matrix).



## 4. Výsledky

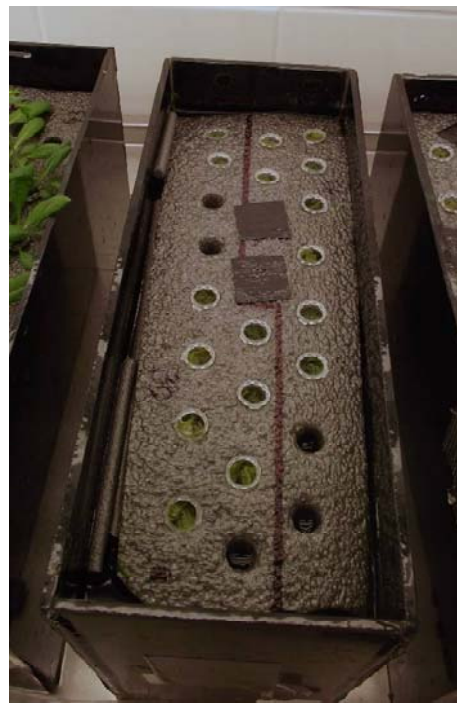
### 4.1. VK1

V rámci tohoto experimentu byly rostliny *TTL3::uidA* (GUS) – linie 30 a *TTL4::uidA* (GUS) - linie 43 pěstovány od počátku kultivace ve variantách se sníženým obsahem N nebo P, pouze do media s přidavkem 100 mM NaCl byly rostliny přesunuty po několika dnech růstu v kontrolním mediu. Vzhledem k téměř stoprocentní úmrtnosti rostlin pěstovaných v přítomnosti NaCl, jsem se rozhodla již tuto variantu do dalších kultivací nezahrnovat. U rostlin pěstovaných od počátku kultivace za snížené dostupnosti P byla pozorována taktéž vysoká úmrtnost (obr. č. 4.1). Z důvodu nízkého počtu přeživších rostlin jsem se rozhodla modifikovat experimentální uspořádání – rostliny nejdříve kultivovat v kontrolním mediu a až po několika dnech růstu je přesunout do jednotlivých variant.

A



B



**Obr. č. 4.1: Dokumentace růstu rostlin během experimentu. VK1.** A - rostliny pěstované v kontrolním mediu, B - rostliny pěstované v mediu s nízkým obsahem fosforu



## 4.2. VK2

Vodní kultura 2 (VK2) byla provedena s cílem charakterizovat změny v aktivitě promotoru *TTL3* a *TTL4* genu v odpovědi na změnu dostupnosti dusíku a fosforu v médiu a popsat jakým způsobem případná změna koresponduje se změnami v růstu a morfologii kořenového systému. Kultivace ve vodní kultuře umožnila snadnou manipulaci se složením kultivačního media, proto bylo možné provést krátkodobou změnu kultivačních podmínek. V rámci experimentu VK2 byly pěstovány dvě linie rostlin ***TTL3::uidA* - linie 30** a ***TTL4::uidA* - linie 43**. Po 13 dnech pěstování rostlin v kontrolním médiu byly rostliny přesunuty do kontrolní varianty a variant s nízkým obsahem dusíku nebo fosforu. Po dalších šesti dnech byl proveden první odběr několika rostlin z každé varianty a všechny živné roztoky byly vyměněny za kontrolní médium. Po 8 dnech byl proveden druhý odběr, při němž byly odebrány zbývající rostliny. Návrat rostlin do kontrolního media byl proveden s cílem zjistit, zda jsou změny v architektuře kořenového systému rostlin a případné změny v aktivitě promotorů *TTL* genů trvalého charakteru, nebo zda dojde k návratu do původního stavu po přenesení rostlin zpět do kontrolních podmínek. Podrobnější schéma experimentu je uvedeno v metodice.

### 4.2.1. První odběr

(13 dní kontrolní medium + 6 dní varianty výživy)

#### 4.2.1.1. Architektura kořenového systému

Rostliny *TTL3::uidA* - linie 30 pěstované při nedostatku dusíku vykazovaly, oproti rostlinám pěstovaným v kontrolním médiu či za nedostatku fosforu, statisticky prokazatelně delší kořenový systém (grafy č. 4.1, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ). Na rozdíl od délky postranních kořenů, která je u rostlin trpících dusíkem prokazatelně odlišná od ostatních variant, nelze v délce hlavního kořene pozorovat statisticky průkazný rozdíl v závislosti na složení živného média, (grafy č. 4.1, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ). Na výrazně delším kořenovém systému rostlin pěstovaných v médiu s nízkým obsahem dusíku se tedy podílí delší postranní kořeny, nikoliv však počet PK, protože tento parametr se statisticky prokazatelně lišil pouze u rostlin trpících nedostatkem fosforu (grafy č. 4.1, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ).

U rostlin *TTL4::uidA* - linie 43 jsou rozdíly v parametrech charakterizujících architekturu kořenového systému mezi různými živinami podobné jako u rostlin *TTL3::uidA* - linie 30. Stejně jako u výše popsané linie prokazují rostliny trpící nedostatkem dusíku

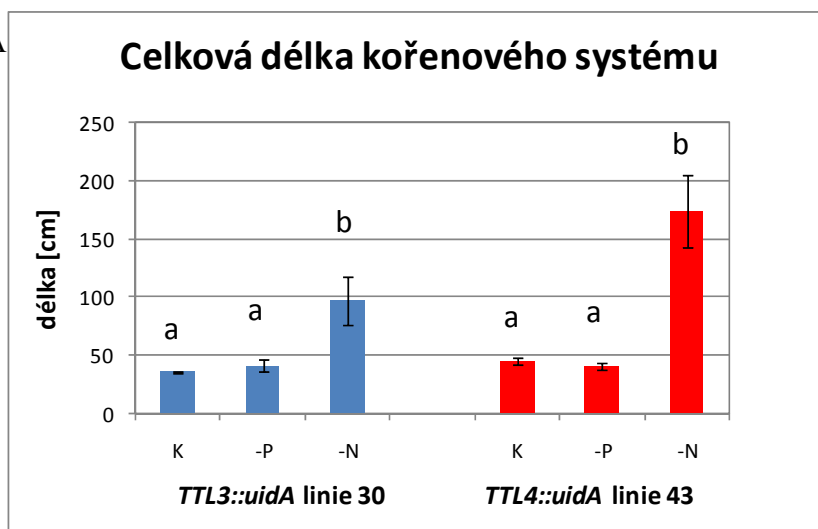
signifikantní rozdíly v celkové délce kořenového systému a délce postranních kořenů oproti rostlinám pěstovaným v kontrolním médiu a médiu s nízkým obsahem fosforu (grafy č. 4.1, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ). Rostliny trpící nedostatkem dusíku se od ostatních experimentálních variant liší i v délce hlavního kořene. Rostliny rostoucí v médiu se sníženým obsahem dusíku nebo fosforu vykazují prokazatelně větší počet postranních kořenů oproti rostlinám kontrolním (grafy č. 4.1, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ).

Z odpovědí obou rostlinných linií na pěstování v různých variantách živných roztoků, které byly testovány pomocí analýzy variance s dvojítm tříděním (Two-Way ANOVA, Friedman,  $\alpha = 0,05$ ) vyplývá, že *TTL3::uidA* - linie 30 a *TTL4::uidA* - linie 43 reagují na varianty kultivačního roztoku stejným způsobem. U žádného ze sledovaných morfologických parametrů kořenového systému nebyly nalezeny statisticky průkazné interakce mezi faktory (linie x varianta media): celková délka kořenového systému (F-Ratio = 3,43,  $p = 0,0663$ ), celková délka postranních kořenů (F-Ratio = 2,95,  $p = 0,0905$ ), délka hlavního kořene (F-Ratio = 2,71,  $p = 0,107$ ) a počet postranních kořenů (F-Ratio = 2,65,  $p = 0,111$ ).

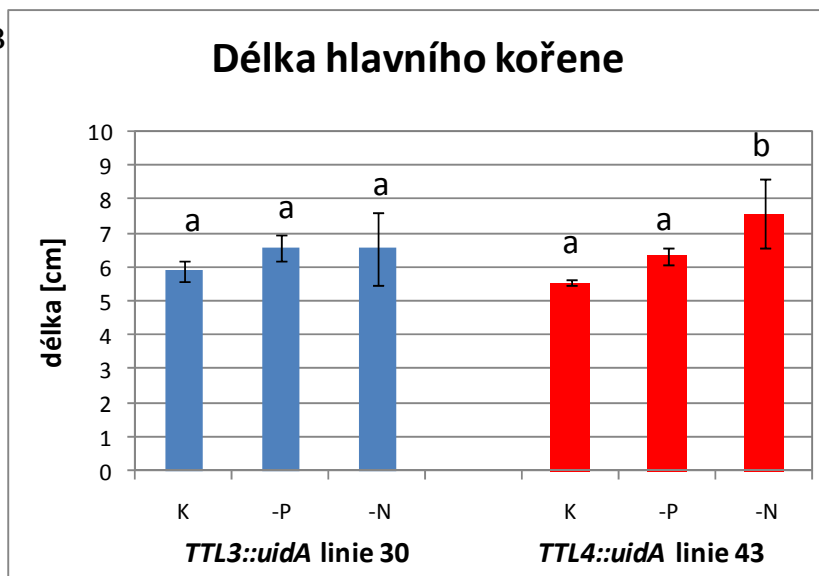
#### Grafy č. 4.1: Charakteristika kořenového systému rostlin – 1. odběr

A - celková délka kořenového systému, B - délka hlavního kořene, C - délka PK, D - počet PK [průměrné hodnoty  $\pm$  SE,  $n = 3-4$ , rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi variantami v rámci jedné linie (One-Way ANOVA, Turkey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ )]

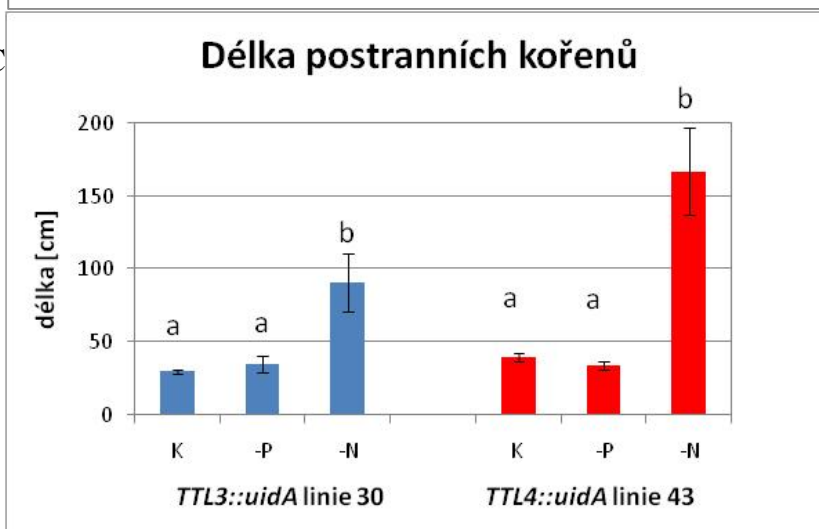
4.2-A



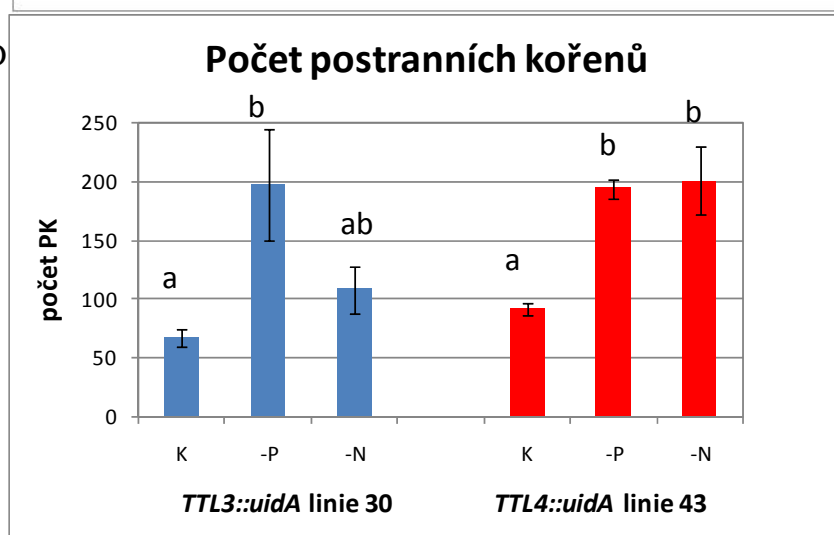
4.3-B



4.4-C



4.5-D

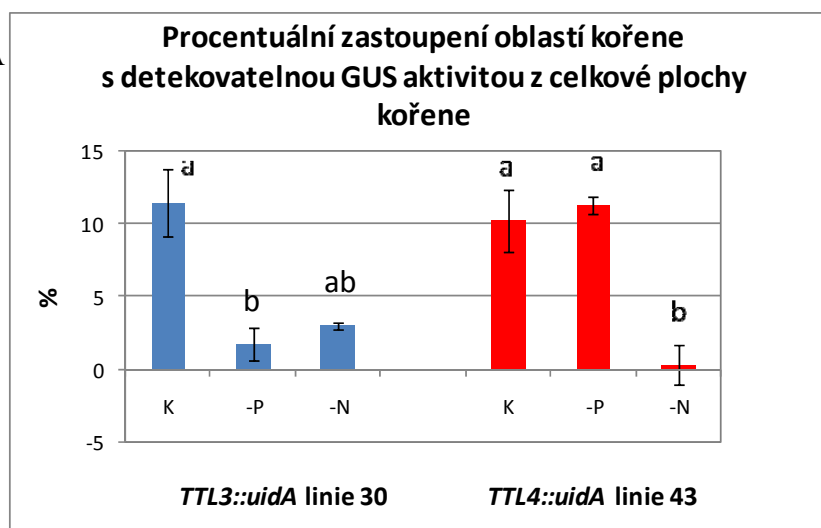


#### 4.2.1.2 Analýza aktivity promotoru

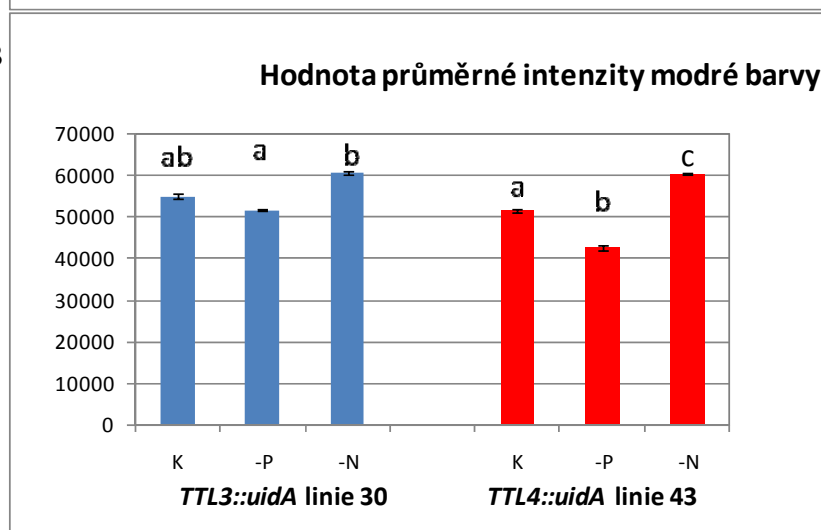
##### Grafy č. 4.2: Analýza exprese GUS pro VK2 – 1. odběr

A- procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene, B - hodnota průměrné intenzity modré barvy [průměrné hodnoty  $\pm$  SE,  $n = 3-4$ , rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi variantami v rámci jedné linie (One-Way ANOVA, Turkey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ )]

4.2 -A



4.2 -B



U rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 pěstovaných při nedostatku fosforu bylo v kořenovém systému prokazatelně méně oblastí s detekovatelnou GUS aktivitou ve srovnání s rostlinami pěstovanými v kontrolním médiu (grafy č. 4.2, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ). Rostliny trpící nedostatkem fosforu navíc vykazovaly statisticky rozdílné hodnoty průměrné intenzity modré barvy oproti rostlinám trpícím nedostatkem dusíku, konkrétně u nich byla hodnota tohoto faktoru nižší než u zbývajících dvou variant (grafy č. 4.2, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ).

Z definice parametru průměrné intenzity vyplývá, že čím je hodnota tohoto parametru nižší, tím tmavší modrou barvu můžeme pozorovat.

V případě rostlin *TTL4::uidA* - linie 43, oproti druhé linii, vykazovaly naopak rostliny vystavené nedostatku dusíku menší procentuální zastoupení oblastí s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene (grafy č. 4.2, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ). Hodnota průměrné intenzity modré barvy se lišila v závislosti na složení živného roztoku (grafy č. 4.2, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ).

Porovnáme-li obě rostlinné linie v závislosti na použitém živném roztoku, pak obě linie vykazovaly rozdílné procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou aktivitou GUS z celkové plochy kořene právě v závislosti na variantě živného roztoku (Two-Way ANOVA, interakce linie x varianta média: F-Ratio = 19,22,  $p = 0,000181$ ). I parametr průměrné intenzity modré barvy u obou linií závisel na ošetření daným živným roztokem (Two-Way ANOVA, interakce linie x varianta média: F = 25,28,  $p = 0,00005$ ).

#### **4.2.1.3. Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotami analýzy exprese GUS**

Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a procentuálním zastoupením oblastí s detekovatelnou aktivitou GUS nebyla pro *TTL3::uidA* - linii 30 prokázána (Spearmanův korelační koeficient = -0,300,  $p = 0,433$ ) na rozdíl od *TTL4::uidA* - linii 43 (Spearmanův korelační koeficient = -0,883,  $p = 0,00159$ ), kde byla korelace záporná. U rostlin *TTL3::uidA* - linii 30 nebyla prokázána ani korelace mezi hodnotou průměrné intenzity modré barvy a celkovou délkou kořenového systému (Spearmanův korelační koeficient = +0,383,  $p = 0,308$ ).

Rostliny *TTL4::uidA* - linii 43 vykazovaly průkaznou korelaci mezi těmito dvěma parametry. Korelace mezi hodnotou průměrné intenzity modré barvy a celkovou délkou kořenového systému nabývala kladné hodnoty (Spearmanův korelační koeficient = 0,783,  $p = 0,0125$ ). S rostoucí velikostí kořenového systému roste i hodnota průměrné intenzity modré barvy, tedy, vzhledem k definici parametru, modré zbarvení indikující expresi GUS je světlejší.

#### **4.2.1.4. Analýza aktivity promotoru na mikroskopické úrovni**

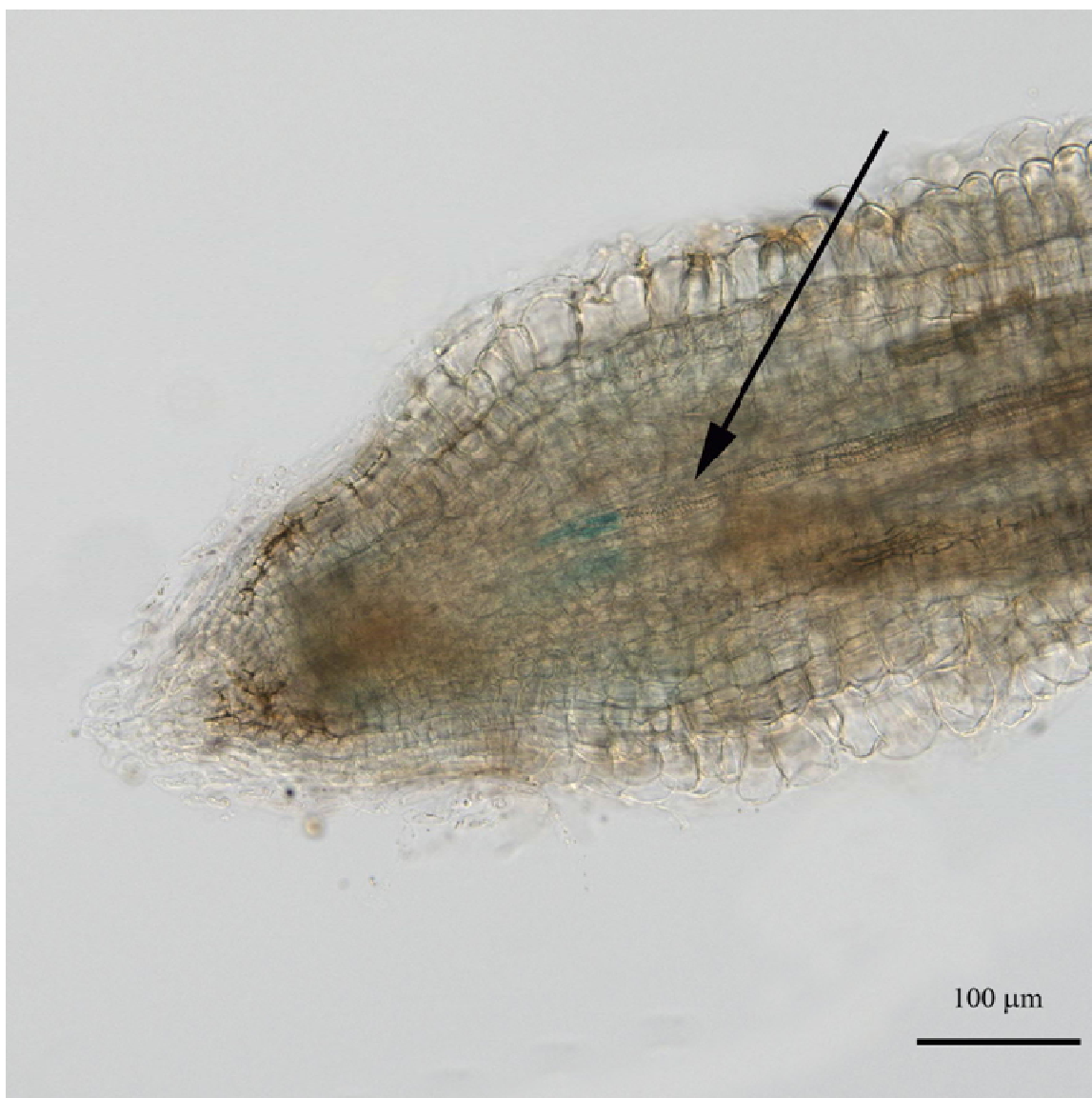
##### ***TTL3::uidA (GUS) - linie 30***

U rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 pěstovaných v kontrolním médiu lze pozorovat aktivitu promotoru *TTL3* v různých fázích vývoje postranních kořenů i v hlavním kořeni (obr. č. 4.4).

V rámci hlavního kořene je modré zabarvení indikující expresi GUS patrné v povrchových strukturách kořenové špičky v distální části meristému. Už v oblasti prodlužovací zóny však exprese v mateřském kořeni postupně mizí, zůstává jen velmi slabě patrná v povrchových vrstvách kořene (rhizodermis/ primární kůra). Ve středním válci zcela chybí. Velmi výrazná exprese se následně objevuje v primordiích postranních kořenů, konkrétně v jejich pozdějších stádiích vývoje (rozmístěná rovnoměrně po celém jejich objemu). Po vynoření z mateřského kořene je u velmi krátkých PK exprese GUS lokalizovaná v povrchových strukturách (rhizodermis/ primární kůra) po celé délce PK. U dlouhých PK zůstává aktivita promotoru patrná u jejich báze a v oblasti špičky, kde se lokalizace shoduje s lokalizací exprese ve špičce hlavního kořene.

U rostlin této linie pěstovaných v médiu s nízkým obsahem fosfátu je patrné snížení intenzity modré barvy značící sníženou aktivitu promotoru oproti kontrolním i N-deficientním rostlinám (obr. č. 4.4). Rostliny trpící nedostatkem fosforu vykazují expresi GUS v oblasti špičky hlavního kořene pouze ostrůvkovitě – v několika málo buňkách distálního meristému. Primordia vykazují opět rovnoměrně rozmístěnou expresi GUS po celé jejich ploše. U nejmenších PK byla exprese GUS lokalizovaná v povrchových strukturách kořene po jeho celé délce. S rostoucí délkou a stářím PK se plocha, na níž dochází k expresi GUS, zmenšuje, postupně zůstává pouze v oblasti špičky a báze. Nakonec mizí exprese GUS i v oblasti báze a zůstává jen ve špičce.

U rostlin trpících nedostatkem fosforu byly pozorovány i tvarové deformace kořene. Špičky hlavních kořenů byly oteklé, stejně tak i špičky dlouhých PK. K diferenciaci xylému u těchto rostlin dochází velmi blízko apikálního meristému (obr. č. 4.2). Postranní kořeny se zde zakládají blízko špičky hlavního kořene (obr. č. 4.3).



**Obr. č. 4.2:** Diferenciace xylému blízko špičky hlavního kořene rostliny *TTL3::uidA* - linie 30 (1. odběr) pěstované v médiu se sníženým obsahem fosforu (šipka ukazuje na diferenciovaný xylém)

Expres GUS je u rostlin trpících nedostatkem dusíku, co se týče lokalizace, velmi podobná rostlinám pěstovaným v kontrolním médiu (obr. č. 4.4). Výrazný rozdíl nebyl ani v intenzitě exprese GUS. Xylém se zde diferencoval v mnohem delší vzdálenosti od špičky hlavního kořene než tomu tak bylo u rostlin trpících nedostatkem fosforu. PK se zde oproti uvedené variantě zakládaly také v mnohem větší vzdálenosti od špičky hlavního kořene (obr. č. 4.3).

**Obr. č. 4.3:** Část hlavního kořene rostliny *TTL3::uidA* (1. odběr) trpící nedostatkem dusíku (A) a nedostatkem fosforu (B)



#### ***TTL4::uidA (GUS) - linie 43***




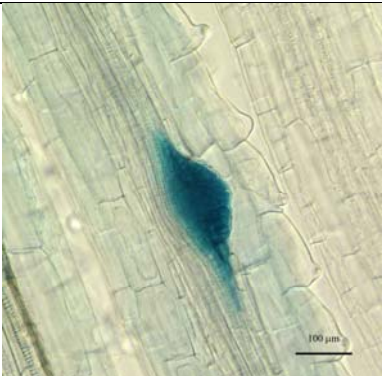
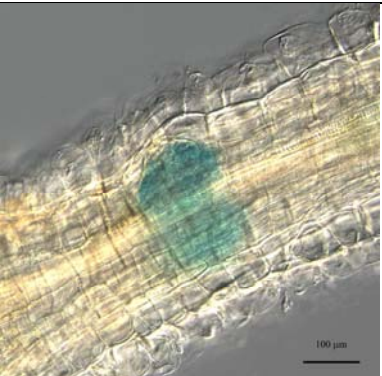
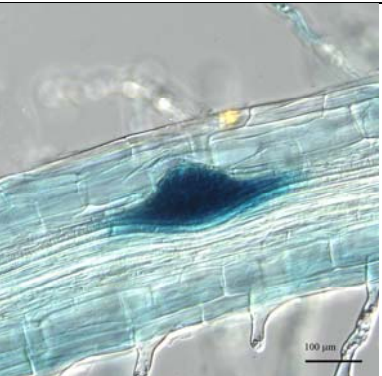

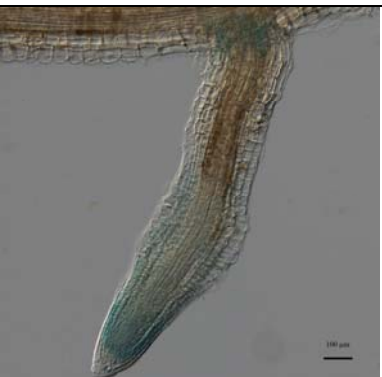
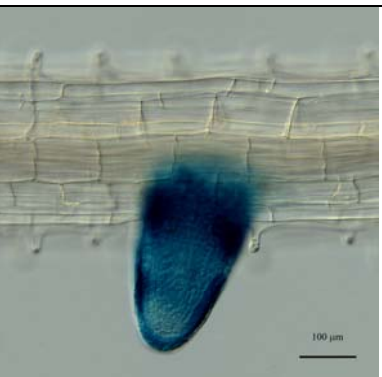
V hlavním kořeni rostlin pěstovaných v kontrolním médiu dochází k expresi reportérového genu pro GUS vloženého pod promotorem genu *TTL4* ve vrcholové části kořenové špičky (v oblasti iniciál). Stejně jako u genu *TTL3* dochází k expresi GUS v pozdějších stádiích vývoje primordií. Krátké postranní kořeny vykazují velmi intenzivní expresi GUS v povrchových strukturách špičky (rhizodermis/ primární kůra) a ve středním válci, v oblasti vyvíjejících se cévních elementů. Oproti expresi GUS ve špičce krátkého PK je exprese ve středním válci mnohem intenzivnější a největší intenzity dosahuje při bázi. S rostoucí délkou postranních kořenů mizí aktivita promotoru ze středního válce od špičky směrem k bázi a dochází ke snížení intenzity exprese ve špičce PK. Exprese je u dlouhých PK nejintenzivnější v jejich bazální části, v oblasti středního válce (obr. č. 4.5).

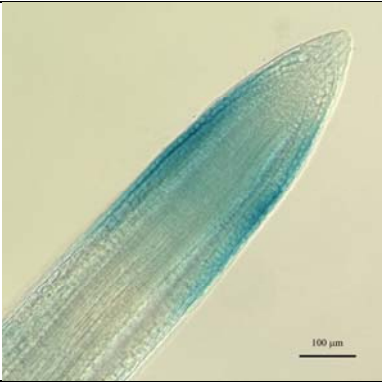

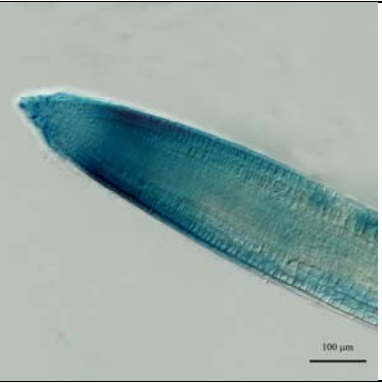

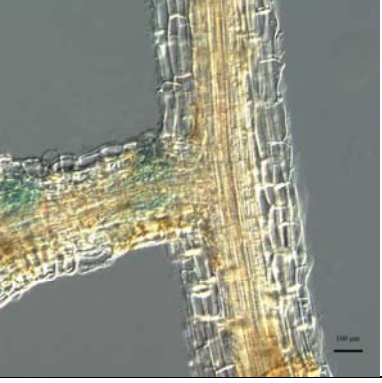
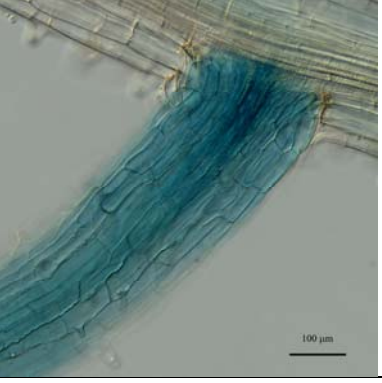


Rostliny pěstované při nedostatku fosforu vykazují výraznější aktivitu promotoru *TTL4* ve špičce hlavního kořene oproti ostatním variantám (obr. č. 4.5). Aktivita je přítomná v celé střední části špičky (meristém i elongační zóna). Exprese se pak v hlavním kořeni objevuje ve středním válci v oblasti výskytu primordií postranních kořenů. Samotná primordia rostlin trpících nedostatkem fosforu vykazují silnější expresi než primordia rostlin pěstovaných v kontrolním médiu avšak v obou případech je exprese přítomna v celém jejich objemu. Malé PK vykazují velmi silnou expresi GUS ve středním válci po celé délce PK. U dlouhých PK je exprese přítomna ve špičce a ve středním válci v oblasti báze. Rostliny pěstované při nedostatku fosforu vykazují stejné změny v charakteru růstu kořenů (otékání špičky, diferenciace xylému a zakládání primordií v těsné blízkosti špičky) jako rostliny *TTL3::uidA* - linie 30.

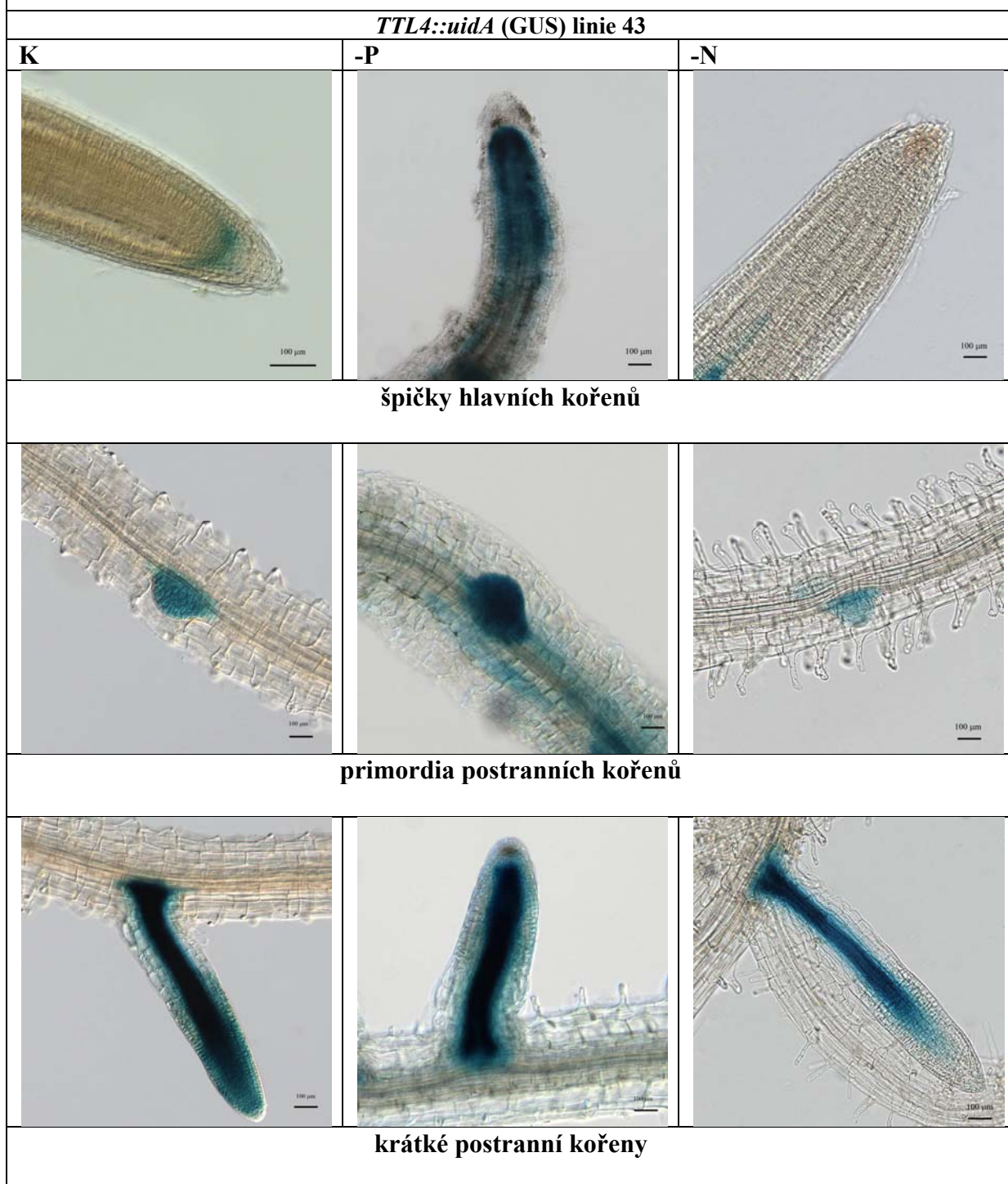
Rostliny trpící nedostatkem dusíku mají oproti rostlinám pěstovaným v kontrolním médiu či médiu se sníženým obsahem fosforu celkově nižší aktivitou promotoru *TTL4* (obr. č. 4.5). Oproti výše popsaným variantám je pozorovatelná i změna lokalizace exprese reportérového genu pro GUS. V případě špičky hlavního kořene dokonce žádnou expresi nepozorujeme vůbec, stejně jako u špiček velmi dlouhých PK, u nichž však zůstává exprese GUS ve středním válci báze. Primordia rostlin trpících nedostatkem dusíku vykazují expresi GUS v celém svém objemu. U krátkých PK pozorujeme expresi GUS ve středním válci bazální části.

**Obr. č. 4.4:** Lokalizace aktivity promotoru *TTL3::uidA* (GUS) - linie 30 v jednotlivých variantách živných roztoků - 1. odběr - VK2 (K = kontrolní médium, -P = médium se sníženým obsahem fosforu, -N = médium se sníženým obsahem dusíku)

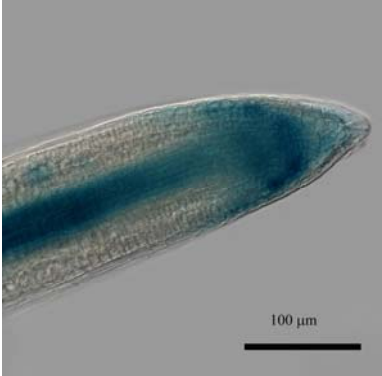

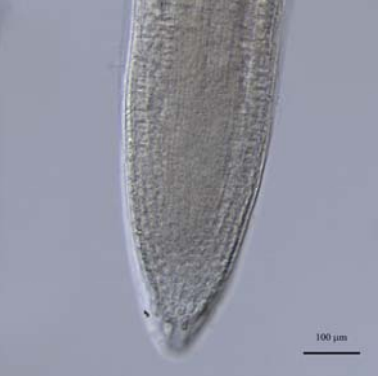

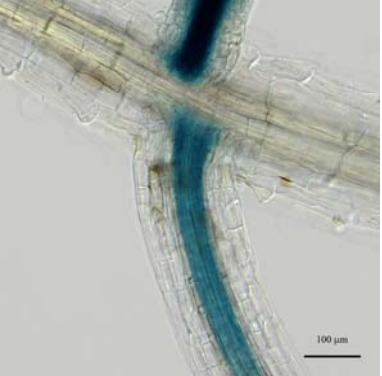
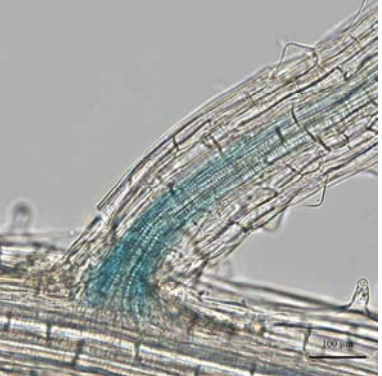
<i>TTL3::uidA</i> (GUS) linie 30		
K	-P	-N
		
špičky hlavních kořenů		
		
primordia postranních kořenů		
		
krátké postranní kořeny		

<i>TTL3::uidA</i> (GUS) linie 30		
K	-P	-N
		
špičky dlouhých postranních kořenů		
		
báze dlouhých postranních kořenů		

**Obr. č. 4.5:** Lokalizace aktivity promotoru *TTL4::uidA* (GUS) - linie 43 v jednotlivých variantách živných roztoků - 1. odběr - VK2 (K = kontrolní médium, -P = médium se sníženým obsahem fosforu, -N = médium se sníženým obsahem dusíku)





<i>TTL4::uidA</i> (GUS) linie 43		
K	-P	-N
 Micrograph showing the tip of a root (K) with strong blue GUS staining in the vascular tissue. A 100 µm scale bar is present in the bottom right.	 Micrograph showing the tip of a root (-P) with strong blue GUS staining in the vascular tissue. A 100 µm scale bar is present in the bottom right.	 Micrograph showing the tip of a root (-N) with no visible GUS staining. A 100 µm scale bar is present in the bottom right.
špičky dlouhých postranních kořenů		
 Micrograph showing the base of a root (K) with strong blue GUS staining in the vascular tissue. A 100 µm scale bar is present in the bottom right.	 Micrograph showing the base of a root (-P) with strong blue GUS staining in the vascular tissue. A 100 µm scale bar is present in the bottom right.	 Micrograph showing the base of a root (-N) with no visible GUS staining. A 100 µm scale bar is present in the bottom right.
báze dlouhých postranních kořenů		

## 4.2.2. Druhý odběr

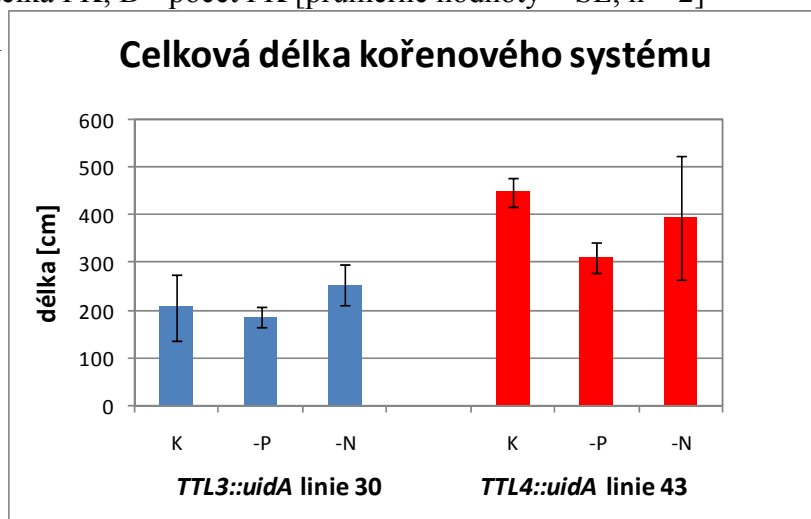
(13 dní kontrolní medium + 6 dní varianty výživy + 8 dní kontrolní medium)

V rámci druhého odběru se podařilo získat v rámci obou linií od každé varianty pouze dvě rostliny, z čehož nelze získat statisticky prokazatelné údaje. Proto musíme získané data brát pouze orientačně. Můžeme z nich alespoň vycházet při posuzování toho, zda změny v architektuře kořenového systému a aktivity promotoru genů *TTL* jsou trvalého charakteru či nikoliv.

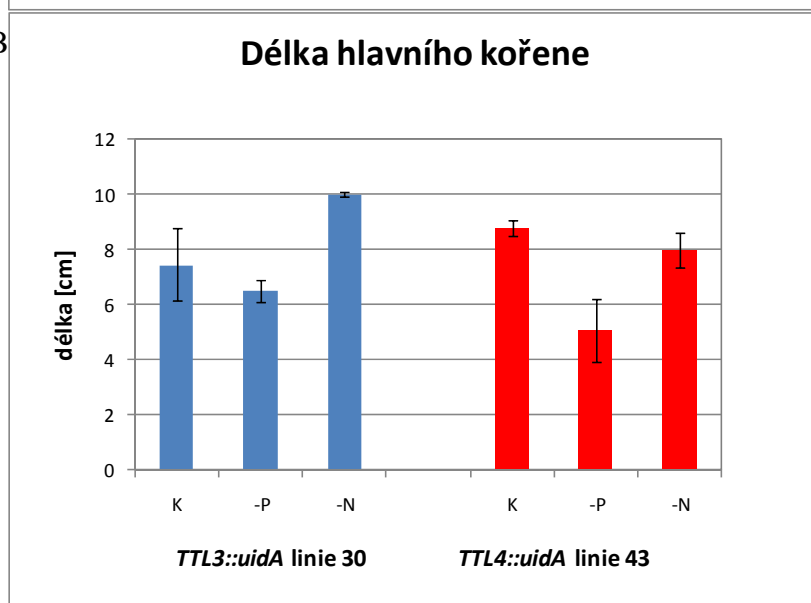
### 4.2.2.1. Architektura kořenového systému

**Grafy č. 4.3:** Charakteristika kořenového systému rostlin - 2. odběr  
A - celková délka kořenového systému, B - délka hlavního kořene,  
C - délka PK, D - počet PK [průměrné hodnoty  $\pm$  SE, n = 2]

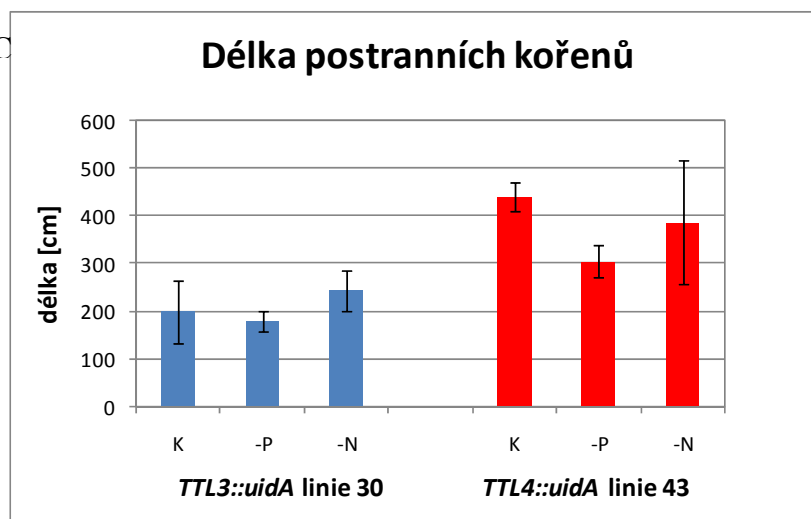
4.3-A



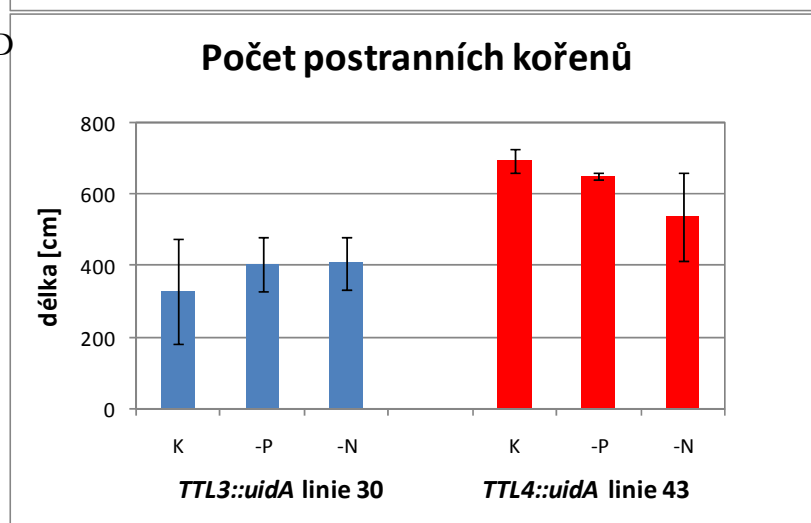
4.3 -B



4.3 -C



4.3 -D



Rostliny *TTL3::uidA* - linie 30 vykazují v rámci variant podobnou celkovou délku kořenového systému (grafy č. 4.3). Což by mohlo nasvědčovat obnovení růstové aktivity u rostlin trpících před přesunem do kontrolního média nedostatkem fosforu. Rostliny, které před přesunem trpěly nedostatkem dusíku, vykazovaly delší hlavní kořen a do určité míry také větší celkovou délku postranních kořenů oproti zbývajícím variantám. Navíc srovnáme-li celkovou délku postranních kořenů u prvního a druhého odběru, je patrný menší rozdíl mezi variantami u druhého odběru. Rostliny pěstované několik dní při nedostatku fosforu zřejmě obnovily růstovou aktivitu, jak je patrné z hodnot celkové délky kořenového systému a délky postranních kořenů. Počet postranních kořenů se mezi variantami nelišil (grafy č. 4.3).

U rostliny *TTL4::uidA* - linie 43 také došlo oproti prvnímu odběru k vyrovnání hodnot celkové délky kořenového systému mezi jednotlivými variantami, což opět můžeme považovat za důkaz obnovení růstové aktivity u rostlin vystavených několik dní nedostatku fosforu po jejich přesunu do kontrolního média (grafy č. 4.3). Kratší délka hlavního kořene u rostlin přesunutých z media s nízkým obsahem fosforu však nasvědčuje, že obnovení růstu

nastává spíše u postranních kořenů. Při porovnání délky postranních kořenů mezi prvním a druhým odběrem můžeme pozorovat menší rozdíly mezi hodnotami tohoto parametru mezi variantami. Oproti prvnímu odběru však nejvíce postranních kořenů vykazovaly rostliny pěstované po celou dobu experimentu v kontrolním médiu. Mezi rostlinami přesunutými z variant ochuzených o jednu z klíčových živin nebyl významný rozdíl (grafy č. 4.3).

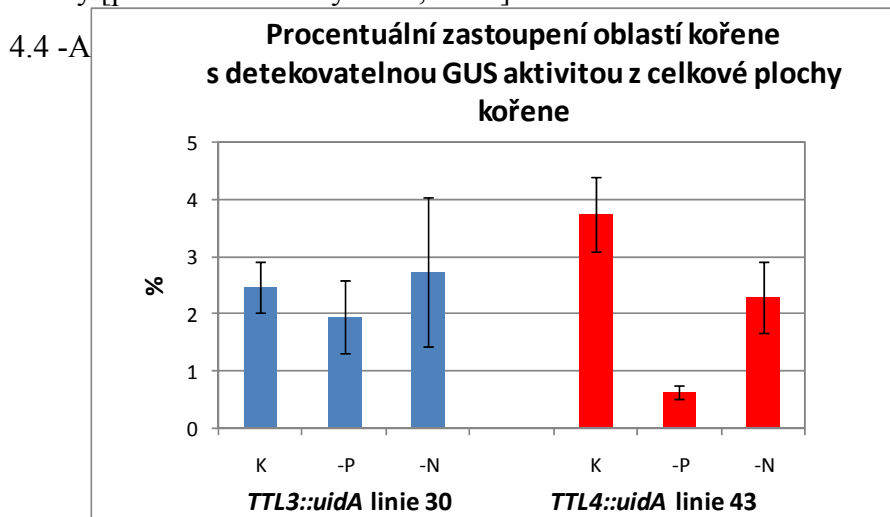
#### 4.2.2.2. Analýza aktivity promotoru

U rostliny *TTL3::uidA* - linie 30 nejsou patrné velké rozdíly v rámci procentuálního zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou mezi rostlinami pěstovanými v kontrolním médiu a rostlinami přesunutými do kontrolního média z roztoků se sníženým obsahem dusíku nebo fosforu (grafy č. 4.4). V rámci hodnoty průměrné intenzity modré barvy, která charakterizuje míru exprese promotoru daného genu, nejsou znatelné rozdíly mezi variantami (grafy č. 4.4).

Rostliny *TTL4::uidA* - linie 43 se liší v rámci procentuálního zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene. Nejvíce oblastí s detekovatelnou GUS aktivitou vykazují rostliny pěstované po celou dobu v kontrolním médiu. Nejméně naopak rostliny přesunuté do kontrolního média z živného média s nízkým obsahem fosforu (grafy č. 4.4). Nejnížší hodnoty průměrné intenzity modré barvy mají rostliny pěstované před přesunem při nedostatku dusíku (grafy č. 4.4). Tyto rostliny byly tedy tmavší než zbývající dvě varianty. V případě prvního odběru však rostliny trpící nedostatkem dusíku vykazovaly opačný trend (grafy č. 4.2).

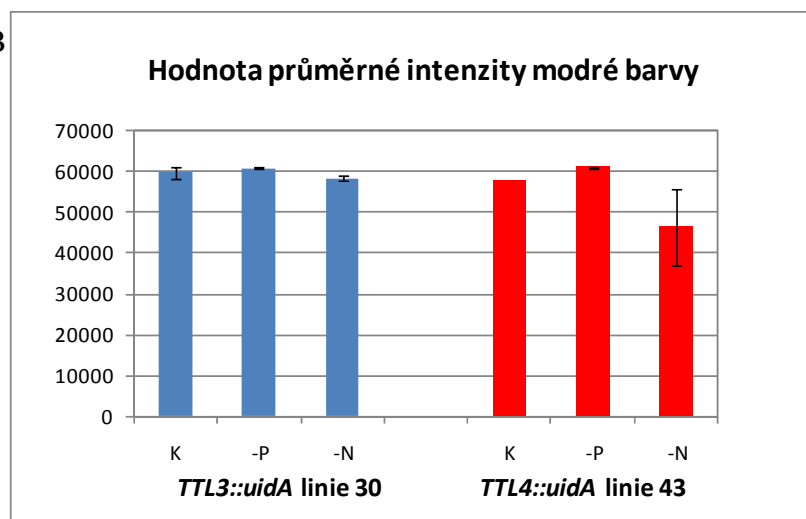
#### Grafy č. 4.4: Analýza exprese GUS pro VK2 – 2. odběr

A - procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene, B - hodnota průměrné intenzity modré barvy [průměrné hodnoty  $\pm$  SE,  $n = 2$ ]





4.4 -B



#### 4.2.2.3. Analýza aktivity promotoru na mikroskopické úrovni

##### *TTL3::uidA (GUS) - linie 30*

U rostliny *TTL3::uidA* - linie 30 pěstovaných po celou dobu v kontrolním médiu docházelo k expresi v rámci hlavního kořene v povrchových strukturách špičky (rhizodermis/primární kůra). Exprese GUS je pak charakteristická pro různá vývojová stadia vývoje PK. Exprese je patrná již u primordií postranních kořenů, kde se můžeme pozorovat modrou barvu rovnoměrně rozloženou v celém jejich objemu. Rovnoměrné rozložení exprese GUS je charakteristické i pro malé postranní kořeny, kde dochází k expresi konkrétně v povrchových strukturách (rhizodermis/ primární kůra) PK po celé jejich délce. U dlouhých PK se exprese omezuje jen na oblast špičky (hlavně laterální kořenová čepička), elongační zóny a báze a to opět do povrchových struktur (rhizodermis/ primární kůra) (obr. č. 4.7).

Rostliny přesunuté z média se sníženým obsahem fosforu do kontrolního média nevykazovaly žádnou expresi GUS ve špičce hlavního kořene. V primordiích, mladých i delších PK je však již lokalizace podobná rostlinám v kontrolní variantě (obr. č. 4.7). Z mikroskopických fotek je také patrné, že nedošlo po přesunu z média s nízkým obsahem dusíku do kontrolního média k obnovení růstu hlavního kořene, neboť hned za špičkou hlavního kořene lze pozorovat velmi dlouhé PK (obr. č. 4.6).

U rostlin pěstovaných před přesunem v médiu s nízkým obsahem dusíku odpovídá lokalizace aktivity promotoru lokalizaci pozorované u rostlin v kontrolní variantě (obr. č. 4.7).



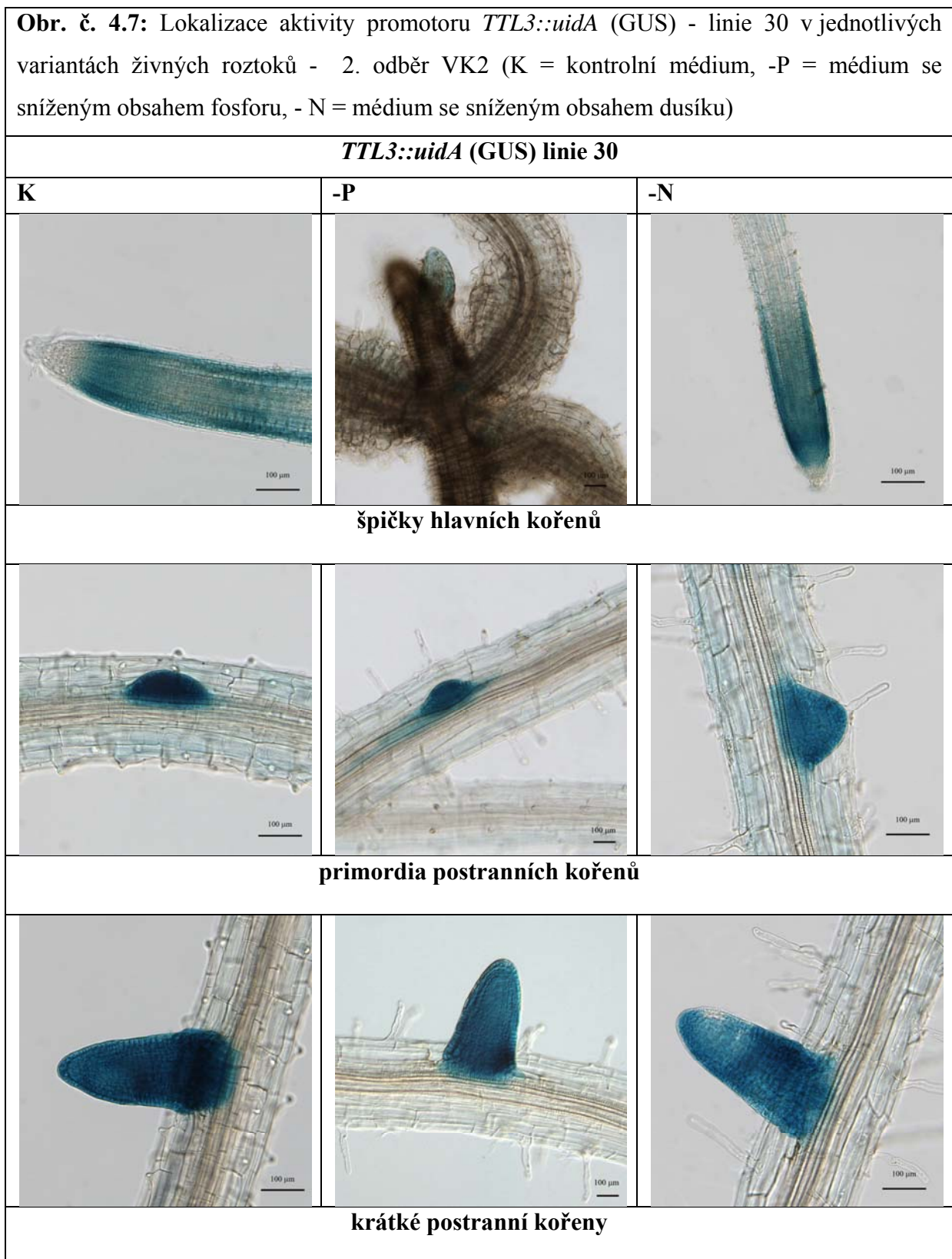
**Obr. č. 4.6:** Rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 pěstovaná 13 dní v kontrolním mediu, 6 dní v mediu s nízkým obsahem fosforu a 8 dní v kontrolním mediu. Lze pozorovat dlouhé PK blízko špičky hlavního kořene.

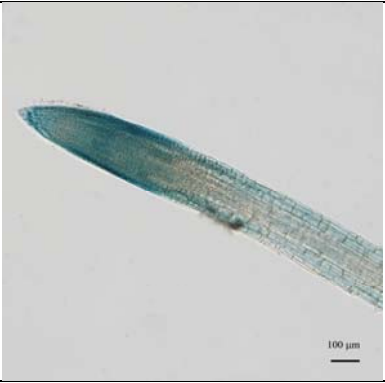
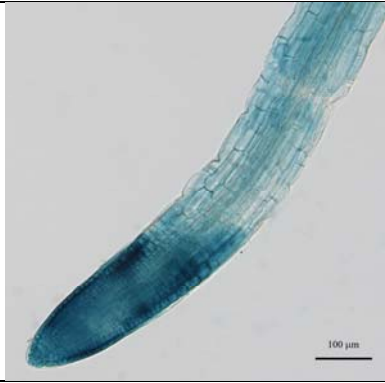
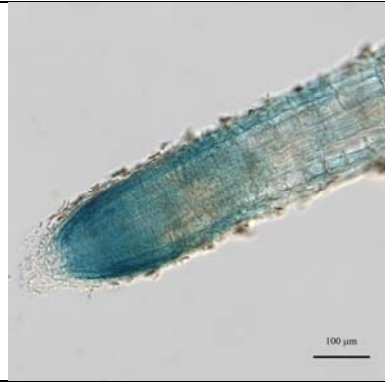
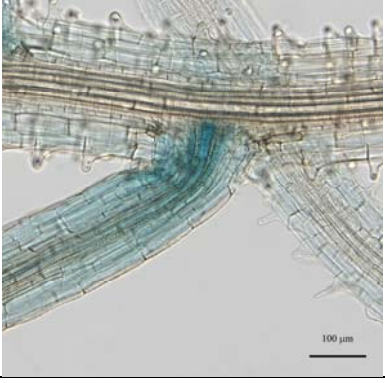
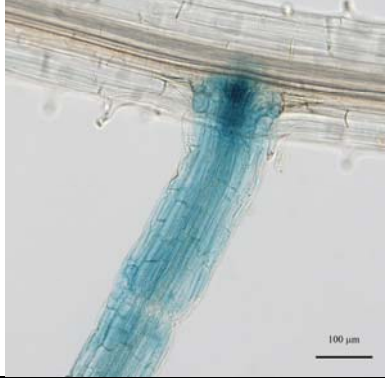
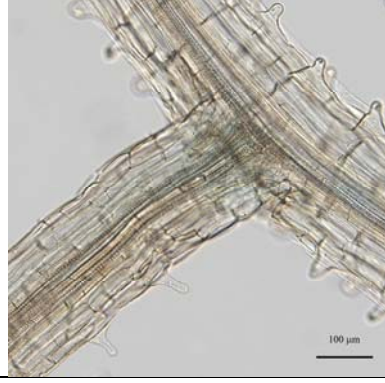
#### ***TTL4::uidA (GUS) - linie 43***

U kontrolních rostlin je patrná jen velmi slabá exprese v oblasti klidového centra a iniciál hlavního kořene. Primordia jsou modrá v celém svém objemu. U malých PK je velmi slabá exprese GUS v oblasti klidového centra a mnohem silnější exprese ve středním válci, nejintenzivnější modrou barvu detekujeme u báze PK. U dlouhých PK je situace velmi obdobná jako u mladých PK (obr. č. 4.8).

Stejně jako u linie 30, nepozorujeme expresi GUS ve špičce hlavního kořene u rostlin přesunutých z média s nízkým obsahem fosforu. Primordia vykazují slabou expresi opět v celém svém objemu. U malých PK pozorujeme expresi ve středním válci s největší intenzitou u báze PK. U dlouhých PK byla lokalizace aktivity promotoru variabilní, někdy pouze ve středním válci při bázi PK, jindy pouze v povrchových vrstvách špičky (obr. č. 4.8). U rostlin po přesunu z média s nízkým obsahem fosforu do kontrolního média došlo, podobně jako u *TTL3::uidA* - linie 30, k obnovení růstové aktivity postranních kořenů, nikoli kořene hlavního.

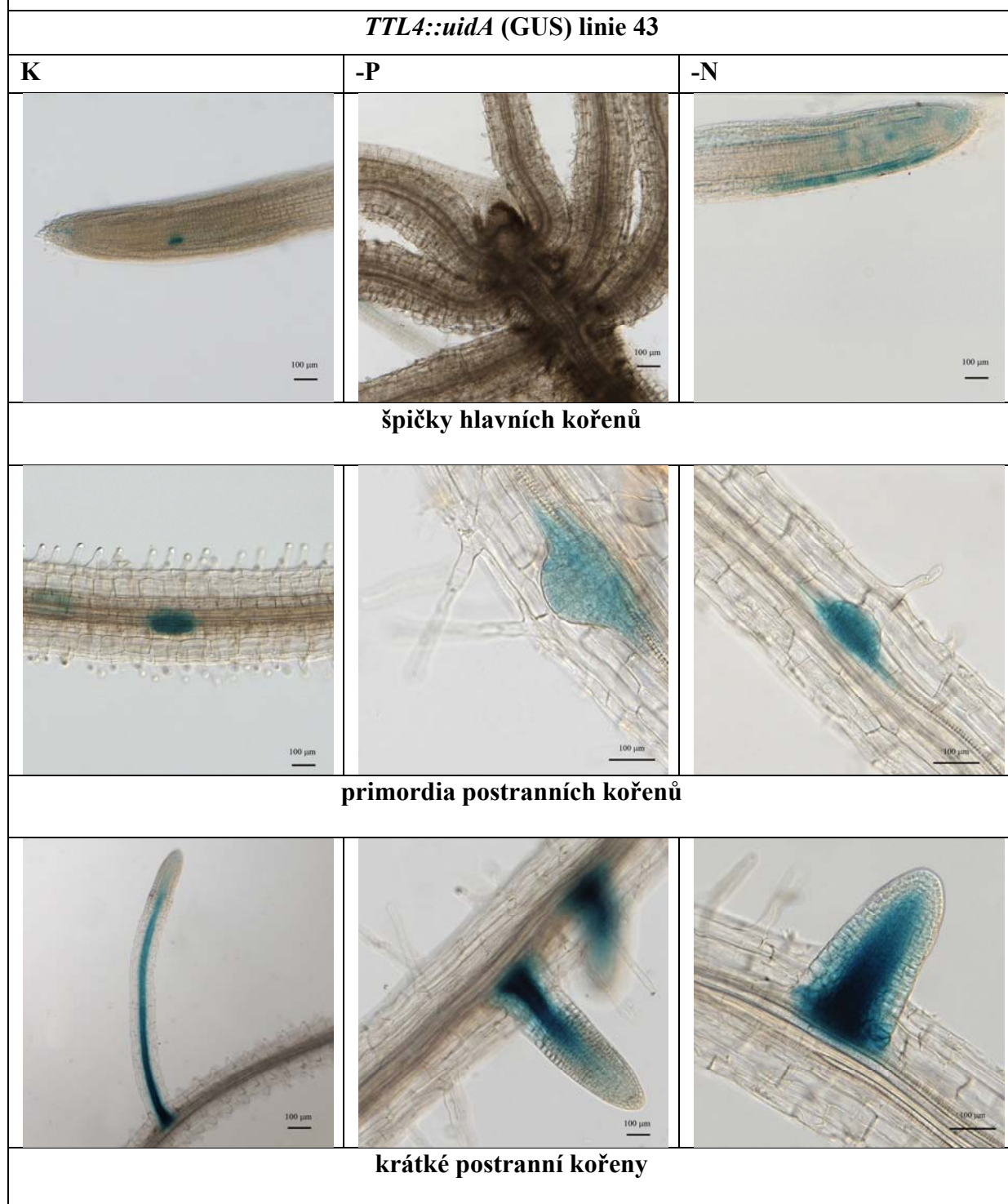
Rostliny přesunuté z média s nízkým obsahem dusíku byla lokalizace exprese GUS podobná rostlinám v kontrolní variantě. U dlouhých PK zůstává exprese v oblasti špičky (oblast iniciál) a báze (obr. č. 4.8).

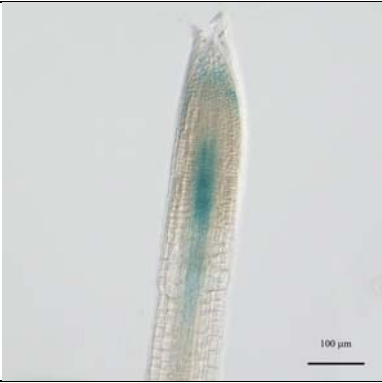
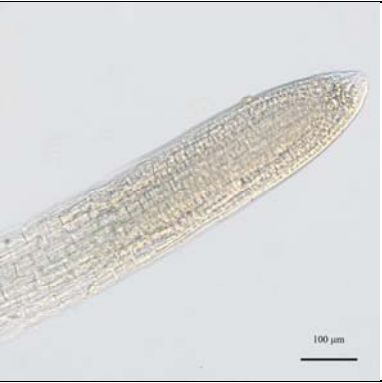
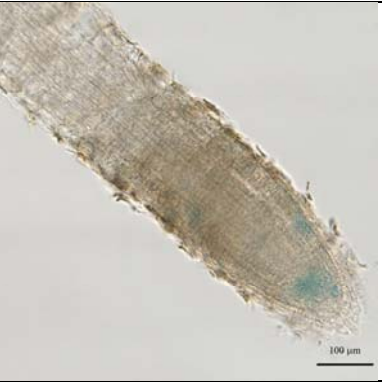





<i>TTL3::uidA</i> (GUS) linie 30		
K	-P	-N
 Micrograph showing the tip of a root (K) stained with GUS activity. The staining is localized to the apical region. A scale bar of 100 µm is present in the bottom right corner.	 Micrograph showing the tip of a root (-P) stained with GUS activity. The staining is localized to the apical region. A scale bar of 100 µm is present in the bottom right corner.	 Micrograph showing the tip of a root (-N) stained with GUS activity. The staining is localized to the apical region. A scale bar of 100 µm is present in the bottom right corner.
špičky dlouhých postranních kořenů		
 Micrograph showing the base of a root (K) stained with GUS activity. The staining is localized to the apical region. A scale bar of 100 µm is present in the bottom right corner.	 Micrograph showing the base of a root (-P) stained with GUS activity. The staining is localized to the apical region. A scale bar of 100 µm is present in the bottom right corner.	 Micrograph showing the base of a root (-N) stained with GUS activity. The staining is localized to the apical region. A scale bar of 100 µm is present in the bottom right corner.
báze dlouhých postranních kořenů		



**Obr. č. 4.8:** Lokalizace aktivity promotoru *TTL4::uidA* (GUS) - linie 43 v jednotlivých variantách živných roztoků - 2.odběr VK2 (K = kontrolní médium, -P = médium se sníženým obsahem fosforu, -N = médium se sníženým obsahem dusíku)



<i>TTL4::uidA</i> (GUS) linie 43		
K	-P	-N
		
špičky dlouhých postranních kořenů		
		
báze dlouhých postranních kořenů		

### 4.3. VK3

Vodní kultura 3 (VK3) byla provedena s transgenními rostlinami nesoucími reportérový gen pro GUS pod promotorem TTL genů, u kterých byla v předchozích experimentech pozorována lokalizace aktivity promotoru v kořenovém systému rostlin *Arabidopsis thaliana* (*TTL1*, *TTL3*, *TTL4*). Zároveň byly zařazeny vždy dvě nezávisle transformované linie a pro každou z nich větší soubor rostlin. Konkrétně byly pěstovány následující rostlinné linie: *TTL1::uidA* - linie 102, *TTL1::uidA* - linie 83, *TTL3::uidA* - linie 32, *TTL3::uidA* - linie 30, *TTL4::uidA* - linie 40 a *TTL4::uidA* - linie 43.

VK3 byla provedena s cílem ověřit výsledky lokalizace aktivity promotoru u rostlinných linií *TTL3::uidA* - linie 30 a *TTL4::uidA* - linie 43, které byly získány v kultivaci VK2. Navíc byla oproti předchozímu experimentu charakterizována lokalizace aktivity promotoru genu *TTL1*.

Všechny zkoumané rostlinné linie byly pěstovány nejdříve v kontrolním médiu po dobu 13 dnů. Poté byla část rostlin odebrána (první odběr) a zbylé byly přesunuty do jednotlivých variant živných roztoků (kontrolní médium, roztoky se sníženým obsahem dusíku nebo fosforu), kde byly ponechány 6 dní. Po nich byly rostliny odebrány (druhý odběr) a analyzovány způsobem popsáným v kapitole Materiál a metodika.

#### 4.3.1. První odběr

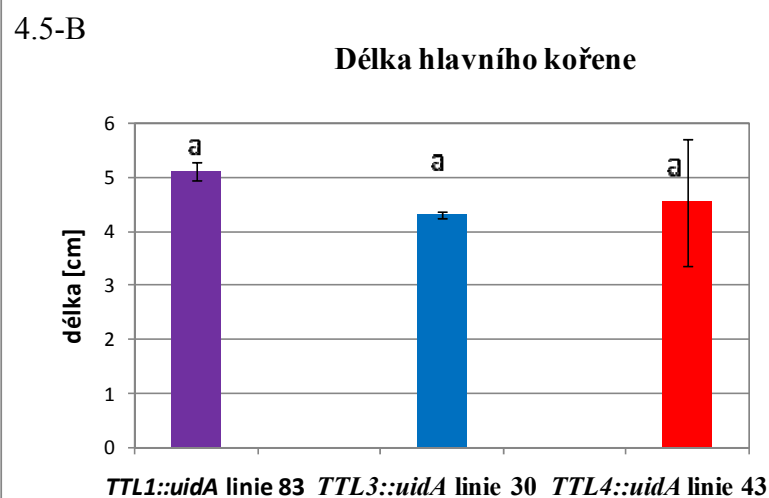
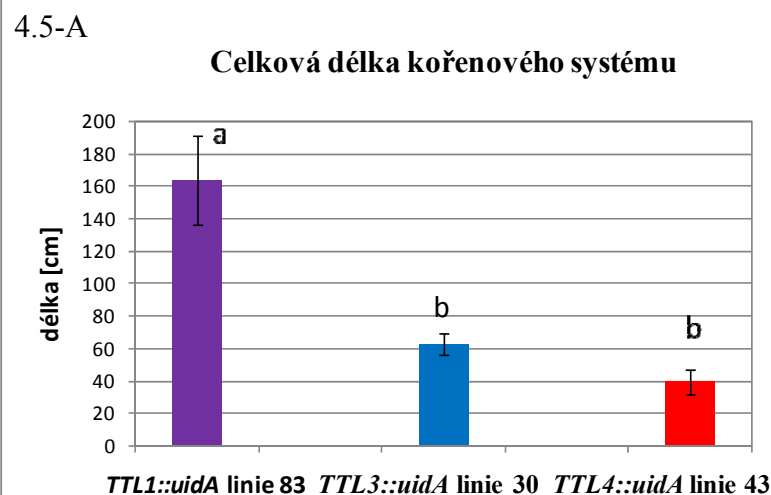
(po 13 dnech růstu v kontrolním médiu)

##### 4.3.1.1. Architektura kořenového systému

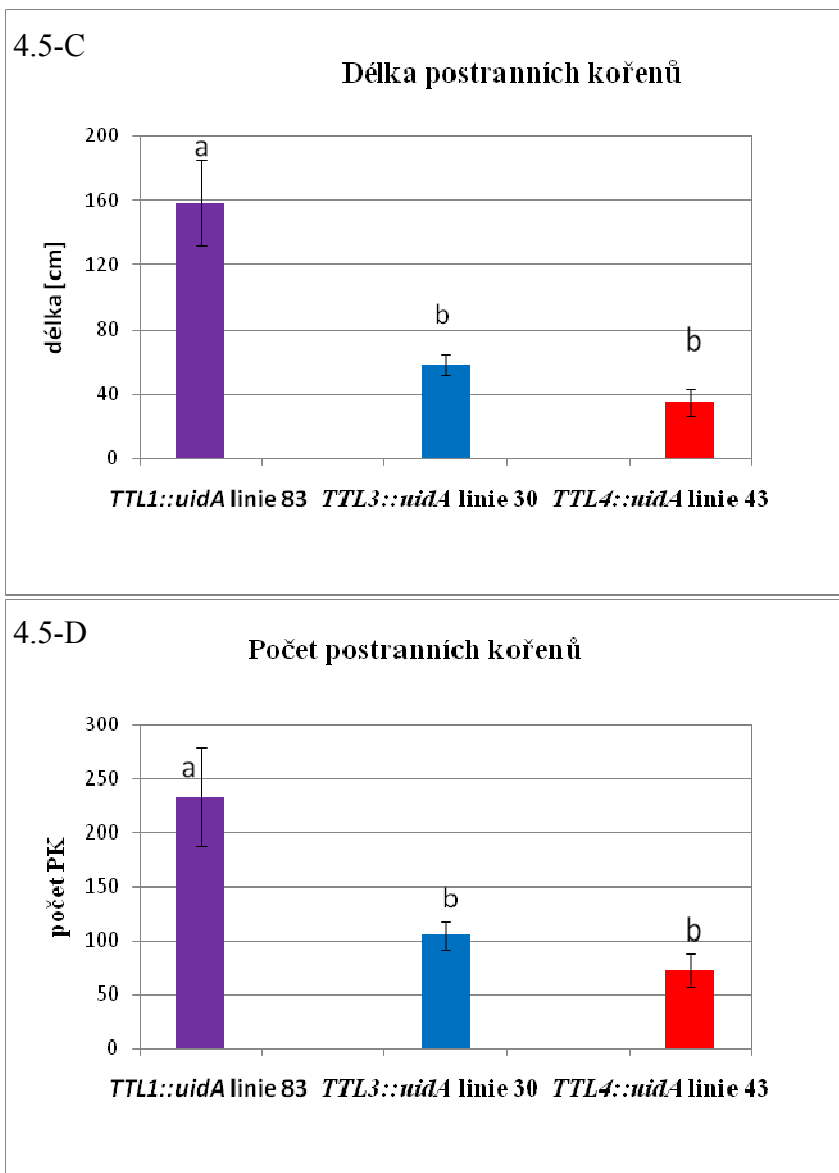
Architektura kořenového systému byla detailně hodnocena u třech vybraných linií, zastupujících tři sledované TTL geny (*TTL1::uidA* - linie 83, *TTL3::uidA* - linie 30 a *TTL4::uidA* - linie 43). Výsledky analýzy ukazují trend, který byl naznačen i v případě velikosti listových růžic. Rostliny *TTL1::uidA* - linie 83 vykazují větší rychlost růstu. Jejich kořenový systém je v kontrolním médiu statisticky prokazatelně delší než u rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 a *TTL4::uidA* - linie 43 (grafy č. 4.5, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ). Při zaměření se na konkrétní parametry kořenového systému vyplývá, že jednotlivé linie rostlin se signifikantně nelišily v délce hlavního kořene (grafy č. 4.5, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ), rozdílly však spočívaly v délce a počtu PK. Rostliny *TTL1::uidA* - linie 83 vykazovaly větší počet delších PK (grafy č. 4.5, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ).

**Grafy č. 4.5:** Charakteristika kořenového systému rostlin – 1. odběr po 13 dnech růstu v kontrolním mediu

A - celková délka kořenového systému, B - délka hlavního kořene, C - délka PK, D - počet PK [průměrné hodnoty  $\pm$  SE, n = 5-6, rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi liniemi (One-Way ANOVA, Turkey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ )]







#### 4.3.1.2 Analýza aktivity promotoru

Rostliny *TTL1::uidA* - linie 83 měly oproti zbývajícím liniím signifikantně větší procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene. Dosahovala více jak 30%, oproti <10% u *TTL3::uidA* - linie 30 a *TTL4::uidA* - linie 43 (graf č. 4.6). V hodnotě průměrné intenzity modré se odlišovaly rostliny *TTL4::uidA* - linie 43, které oproti zbývajícím liniím měly tuto hodnotu statisticky nižší. Na rostlinách jsme tedy pozorovali výrazně tmavší modrou barvu než u rostlin *TTL1::uidA* - linie 83 nebo *TTL3::uidA* - linie 30 (graf č. 4.6, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ).

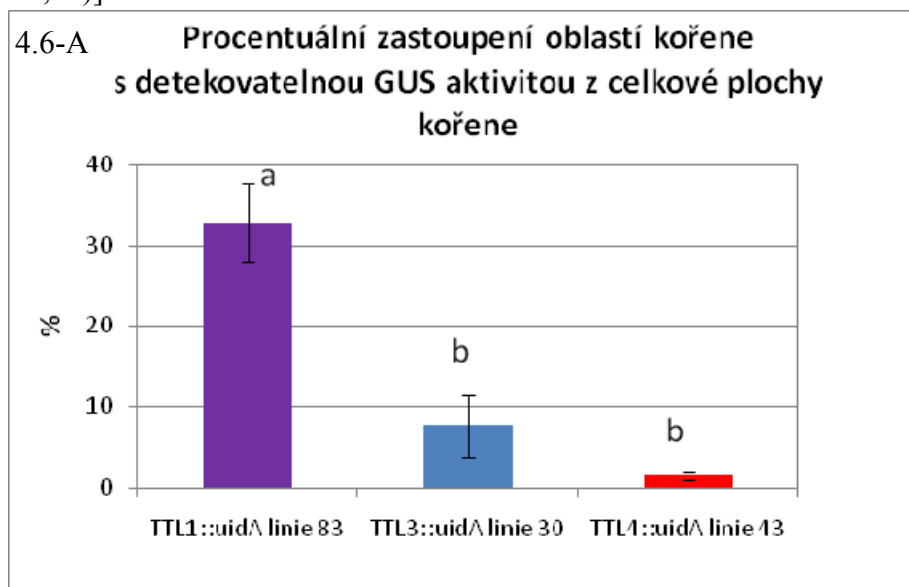
#### 4.3.1.3 Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a aktivitou promotoru

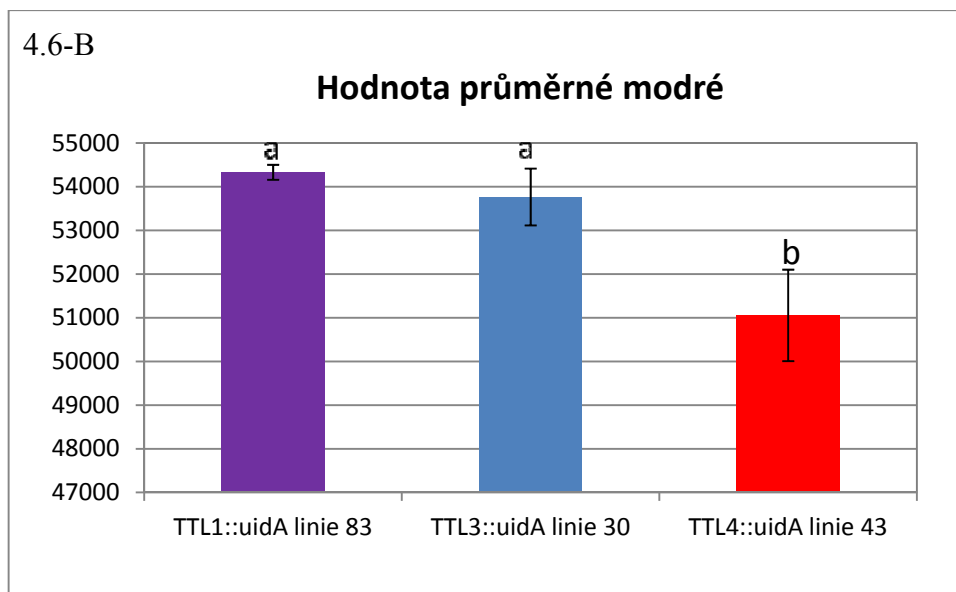
Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a procentuálním zastoupením oblastí s detekovatelnou aktivitou GUS nebyla prokázána ani pro jednu z pěstovaných linií: *TTL1::uidA* - linii 83 (Spearmanův korelační koeficient = -0,300,  $p = 0,624$ ), *TTL3::uidA* - linii 30 (Spearmanův korelační koeficient = 0,0900,  $p = 0,848$ ), *TTL4::uidA* - linii 43 (Spearmanův korelační koeficient = 0,0286,  $p = 0,957$ ).

Stejně tak nebyla prokázána korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotou průměrné modré u žádné z rostlinných linií: *TTL1::uidA* - linii 83 (Spearmanův korelační koeficient = -0,300,  $p = 0,624$ ), *TTL3::uidA* - linii 30 (Spearmanův korelační koeficient = 0,162,  $p = 0,728$ ), *TTL4::uidA* - linii 43 (Spearmanův korelační koeficient = 0,600,  $p = 0,208$ ).

**Grafy č. 4.6:** Analýza exprese GUS pro VK3 – 1. odběr po 13 dnech růstu v kontrolním mediu

A - procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene, B - hodnota průměrné modré [průměrné hodnoty  $\pm$  SE,  $n = 5-7$ , rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi liniemi (One-Way ANOVA, Turkey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ )]





### 4.3.2. Druhý odběr

(po 13 dnech růstu v kontrolním mediu a 6 dnech ve variantách výživy)

Rostliny každé linie byly pěstovány ve variantách živného roztoku, každá varianta však byla zastoupena dvěma samostatnými nádobami s identickými experimentálními podmínkami. Z důvodu tohoto experimentálního uspořádání byla pro statistické vyhodnocení dat použita hierarchická analýza variance (nested ANOVA). Přestože by rostliny z různých nádob stejné varianty neměly vykazovat rozdíly v hodnocených parametrech, statistická analýza v některých případech prokázala rozdíly mezi kultivačními nádobami dané varianty a poukazuje tak na možné problémy se standardizací kultivace ve vodní kultuře.

#### 4.3.2.1. Analýza nadzemní části rostlin

Na základě statistického zpracování vyplývá, že z rostlin pěstovaných v kontrolním mediu, měly signifikantně nejmenší plochu průmětu listových růžic rostliny *TTL3::uidA* (linie 30 a 32). Největší plochu průmětu listových růžic vykazovaly rostliny *TTL1::uidA* (linie 83 a 102). U rostlin pěstovaných v kontrolním mediu nebyl prokázán vliv nádoby (grafy č. 4.7, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ).

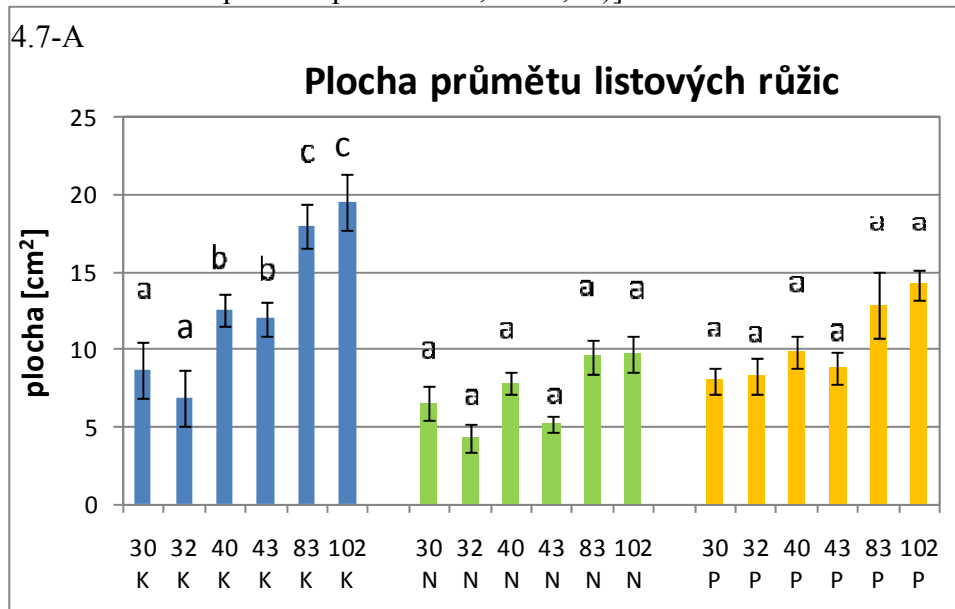
U rostlin trpících nedostatkem fosforu nebyly statisticky prokázány rozdíly ve velikosti nadzemních částí, stejně jako u rostlin trpících nedostatkem dusíku, i když v obou případech lze pozorovat trend větších nadzemních částí u rostlin *TTL1::uidA* (linie 83 i 102) (grafy č. 4.7, Nested-GLM ANOVA).

U rostlinných linií *TTL3::uidA* - linie 32, *TTL3::uidA* - linie 30, *TTL4::uidA* - linie 40 a *TTL4::uidA* - linie 43, *TTL1::uidA* - linie 83 nebyly prokázány statistické rozdíly v hodnotě plochy průmětu listové růžice v závislosti na složení živného média (grafy č. 4.7, Nested-GLM ANOVA).

V rámci rostlinné linie *TTL1::uidA* - linie 102 byly zaznamenány rozdíly v rychlosti růstu v závislosti na složení živného média. Rostliny *TTL1::uidA* - linie 102 pěstované v kontrolním roztoku měly největší plochu listové růžice, nejmenší pak rostliny trpící nedostatkem dusíku (grafy č. 4.7, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ).

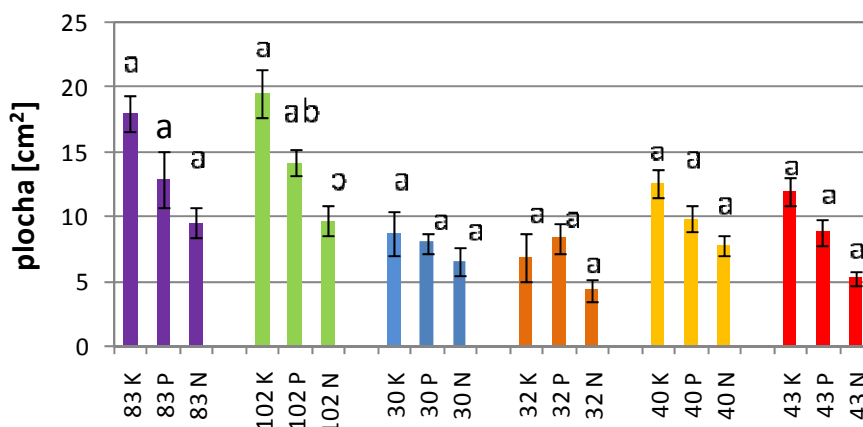
Vliv nádoby na plochu průmětu listových růžic byl zaznamenán pouze u dvou linií: *TTL4::uidA* - linie 40 ( $F = 4,12$ ,  $p = 0,01331$ ) a *TTL4::uidA* - linie 43 ( $F = 3,76$ ,  $p = 0,00255$ ).

**Grafy č. 4.7:** Porovnání hodnot ploch průmětu listových růžic z hlediska složení živného média (nahore) a z hlediska rostlinných linií (dole) [průměrné hodnoty  $\pm$  SE,  $n = 6-15$ , rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi jednotlivými liniemi v rámci stejných variant nebo mezi variantami v rámci jedné linie (Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ )]



4.7-B

### Plocha průmětu listových růžic



## Analýza kořenového systému

### 4.3.2.2. Architektura kořenového systému

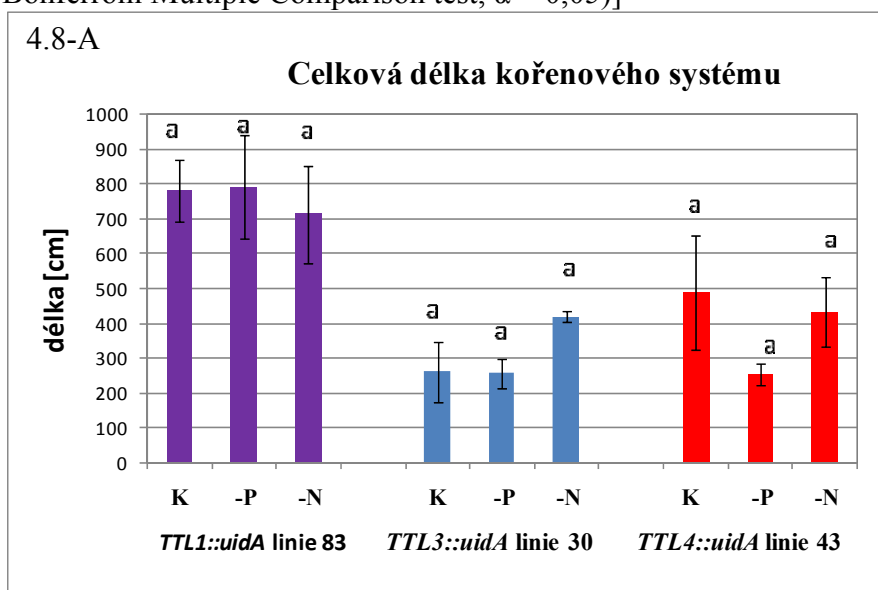
Analýza architektury kořenového systému u rostlin *TTL1::uidA* linie 83 ukazuje, že celková délka kořenového systému ani délka PK nebyla ovlivněna složením živného roztoku. Rostliny trpící nedostatkem dusíku vykazovaly delší hlavní kořen než zbylé varianty, tento trend však nebyl statisticky potvrzen. Statistika, z důvodu odlišných hodnot z jednotlivých nádob, nepotvrdila ani trend vyššího počtu postranních kořenů u rostlin trpících nedostatkem fosforu (grafy č. 4.8, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ). Rozdílné kultivační nádoby neovlivnily počet postranních kořenů ( $F = 3,03$ ,  $p = 0,0719$ ). Na zbývající faktory však byl prokázán vliv kultivační nádoby: celková délka kořenového systému ( $F = 3,55$ ,  $p = 0,0490$ ), délka hlavního kořene ( $F = 5,39$ ,  $p = 0,0140$ ), délka PK ( $F = 3,56$ ,  $p = 0,0486$ ) (Nested-GLM ANOVA).

Rostliny *TTL3::uidA* linie 30 vykazovaly mírně vyšší celkovou délku kořenového systému ve variantě se sníženým obsahem dusíku, tento trend však nebyl statisticky průkazný. Rostliny trpící nedostatkem dusíku měly signifikantně delší hlavní kořen než rostliny pěstované při nedostatku fosforu nebo v kontrolním médiu, délkou postranních kořenů ani jejich počtem se však od ostatních variant nelišily (grafy č. 4.8, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ). V případě této linie nebyl prokázán vliv kultivační nádoby na žádný z výše jmenovaných parametrů kořenového systému (Nested-GLM ANOVA): celková délka kořenového systému ( $F = 0,75$ ,  $p = 0,543$ ), délka hlavního kořene ( $F = 0,69$ ,  $p = 0,577$ ), délka PK ( $F = 0,68$ ,  $p = 0,579$ ) a počet PK ( $F = 1,54$ ,  $p = 0,256$ ).

U rostlin *TTL4::uidA* linie 43 nebyl statisticky prokázán trend naznačující, že rostliny trpící nedostatkem fosforu mají menší celkovou délku kořenového systému i kratší PK než ostatní varianty. V důsledku dat lišících se v závislosti na kultivační nádobě, nebyl statisticky prokázán ani nižší počet PK u rostlin trpících nedostatkem dusíku oproti rostlinám kontrolním nebo pěstovaným při nedostatku fosforu. V délce hlavního kořene se statisticky průkazně lišily všechny varianty – nejdelší hlavní kořen měly rostliny trpící nedostatkem dusíku, nejkratší pak rostliny pěstované v roztoku s nízkým obsahem fosforu (grafy č. 4.8, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ). U délky hlavního kořene nebyl prokázán vliv kultivační nádoby. U ostatních faktorů, jak již bylo výše naznačeno, vliv nádoby byl prokázán: celková délka kořenového systému ( $F = 11,7$ ,  $p = 0,000173$ ), délka PK ( $F = 12,1$ ,  $p = 0,000144$ ), počet PK ( $F = 6,07$ ,  $p = 0,00485$ ).

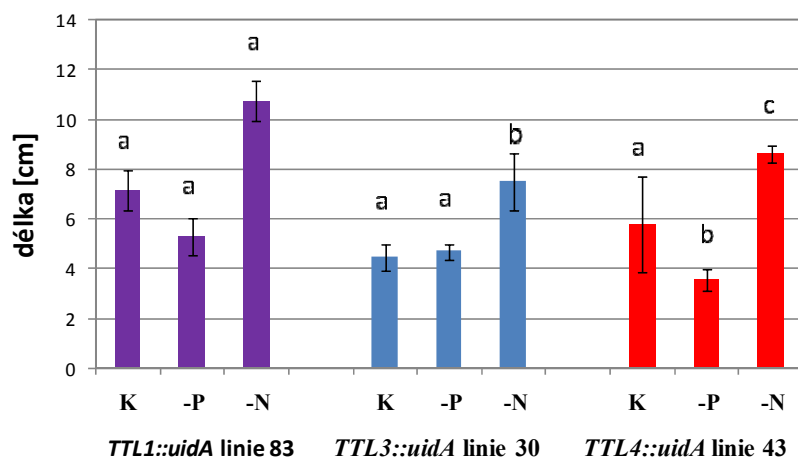
Bylo provedeno také srovnání linií s využitím vícefaktorové hierarchické anovy. Toto srovnání ukazuje, že sledované linie se neliší v odpovědi na varianty výživy (Nested-GLM Anova, interakce linie x varianta kultivace:  $p > 0,05$ ). Rostliny *TTL1::uidA* linie 83 však vykazují delší kořenový systém ( $F = 0,79$ ,  $p = 0,018$ ) a větší délku ( $F = 0,8$ ,  $p = 0,018$ ) i počet postranních kořenů ( $F = 0,67$ ,  $p = 0,034$ ) oproti *TTL3::uidA* linie 30 (Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test).

**Graf č. 4.8:** Charakteristika kořenového systému rostlin – 2. odběr  
A - celková délka kořenového systému, B - délka hlavního kořene, C - délka PK, D - počet PK [průměrné hodnoty  $\pm$  SE,  $n = 3-12$ , rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi variantami v rámci jedné linie (Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ )]



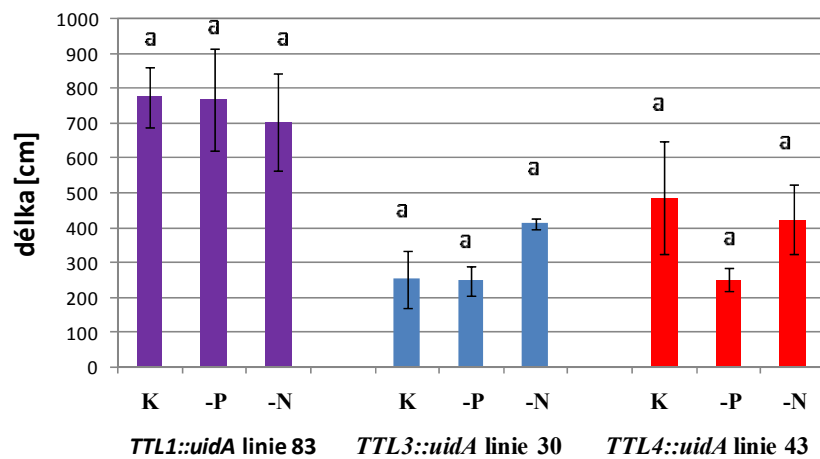
4.8-B

### Délka hlavního kořene



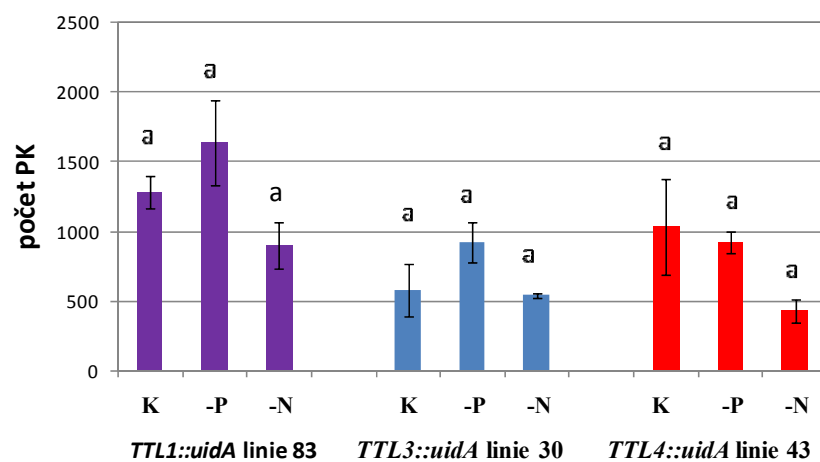
4.8-C

### Délka postranních kořenů



4.8-D

### Počet postranních kořenů



#### 4.3.2.3. Analýza aktivity promotoru

U rostlin *TTL1::uidA* - linie 83 nebyly statisticky prokázány rozdíly mezi variantami v hodnotě průměrné intenzity modré barvy ani v procentuálním zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene, ačkoliv u tohoto faktoru je znatelný trend, že rostliny trpící nedostatkem fosforu vykazovaly nejnížší procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene (grafy č. 4.9, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ). Vliv nádoby byl prokázán pouze u parametru průměrné intenzity modré barvy ( $F = 4,66$ ,  $p = 0,0225$ ).

Rostliny *TTL3::uidA* - linie 30 trpící nedostatkem dusíku vykazovaly výrazně menší procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene oproti variantě se sníženým obsahem fosforu, vůči kontrole se však průkazně nelišily. Rostliny trpící nedostatkem fosforu zase vykazovaly nižší hodnotu průměrné modré, intenzita modré barvy tedy byla u těchto rostlin vyšší než u rostlin rostoucích v médiu s nízkým obsahem dusíku, oproti kontrole se opět průkazně nelišily (grafy č. 4.9, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ). Vliv kultivační nádoby nebyl prokázán u žádného ze sledovaných parametrů (Nested-GLM ANOVA): procentuální zastoupení oblastí s GUS aktivitou ( $F = 0,67$ ,  $p = 0,269$ ), hodnota průměrné intenzity modré barvy ( $F = 0,89$ ,  $p = 0,250$ ).

Nejtmavší intenzitu modré barvy vykazovaly u rostlin *TTL4::uidA* linie 43, rostliny pěstované při snížené dostupnosti fosforu. V procentuálním zastoupení oblastí s detekovatelnou GUS aktivitou se mezi sebou rostliny nelišily (grafy č. 4.9, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ). Vliv nádoby byl prokázán pouze u hodnoty průměrné intenzity modré barvy ( $F = 5,26$ ,  $p = 0,00881$ ).

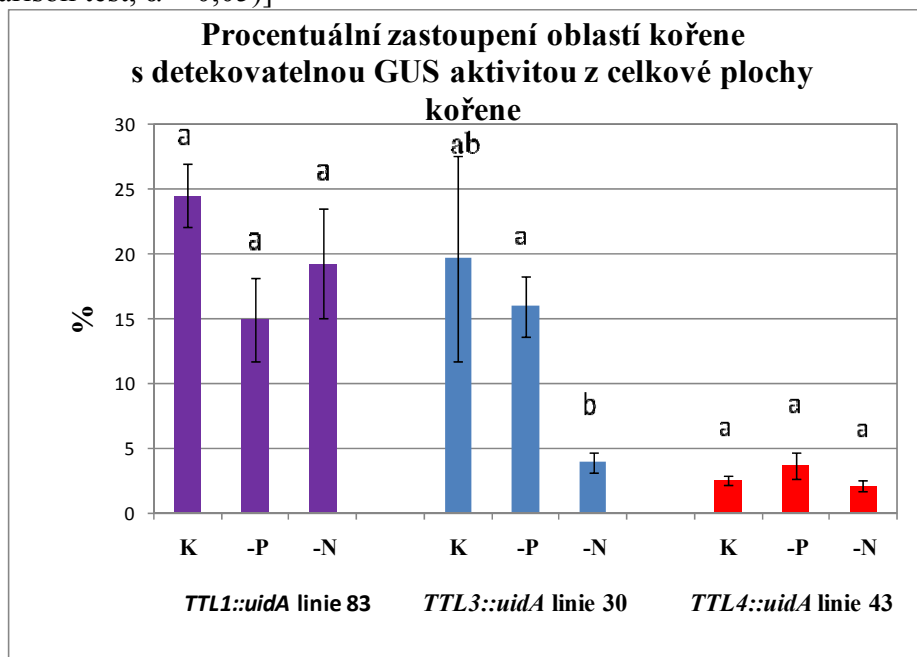
Porovnání linií s využitím vícefaktorové hierarchické anovy ukazuje, že sledované linie se neliší v odpovědi na varianty výživy (Nested-GLM Anova, interakce linie x varianta kultivace:  $p > 0,05$ ). Rostliny *TTL4::uidA* - linie 43 však vykazují nižší procentuální zastoupení plochy s detekovatelnou GUS aktivitou ( $F = 0,9998$ ,  $p = 0,0004$ ) a nižší hodnotu průměrné intenzity modré barvy ( $F = 0,9993$ ,  $p = 0,0006$ ) oproti ostatním liniím (Nested-GLM ANOVA).



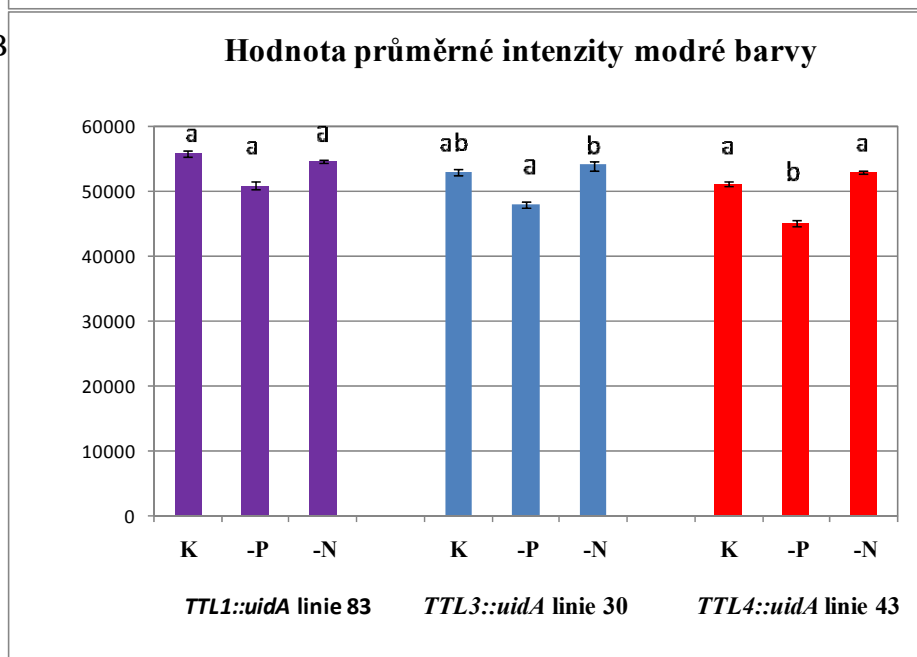
**Grafy č. 4.9:** Charakteristika aktivity promotoru – 2. odběr

A - procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene, B - hodnota průměrné intenzity modré barvy [průměrné hodnoty  $\pm$  SE, n = 4-12, rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi variantami v rámci jedné linie (Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ )]

4.9-A



4.9-B

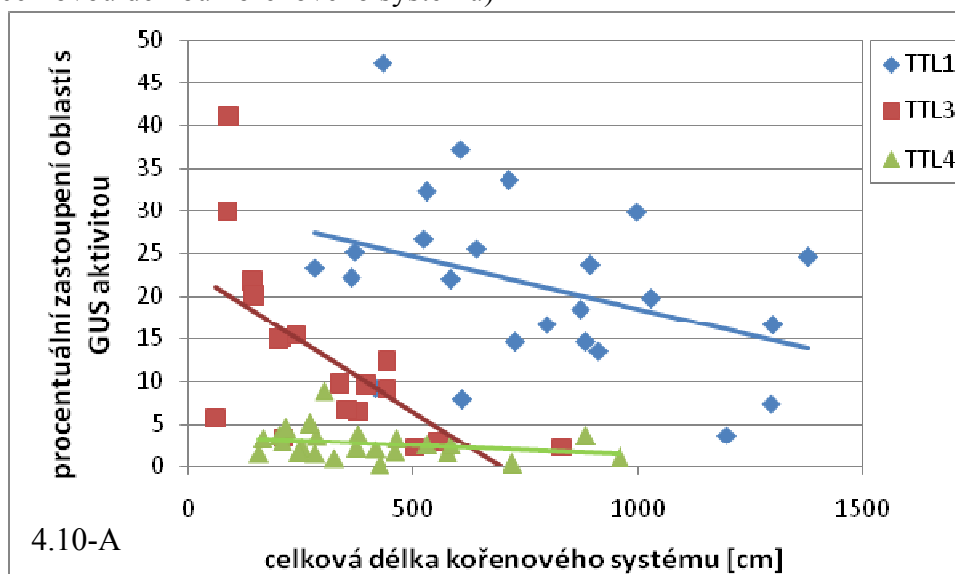


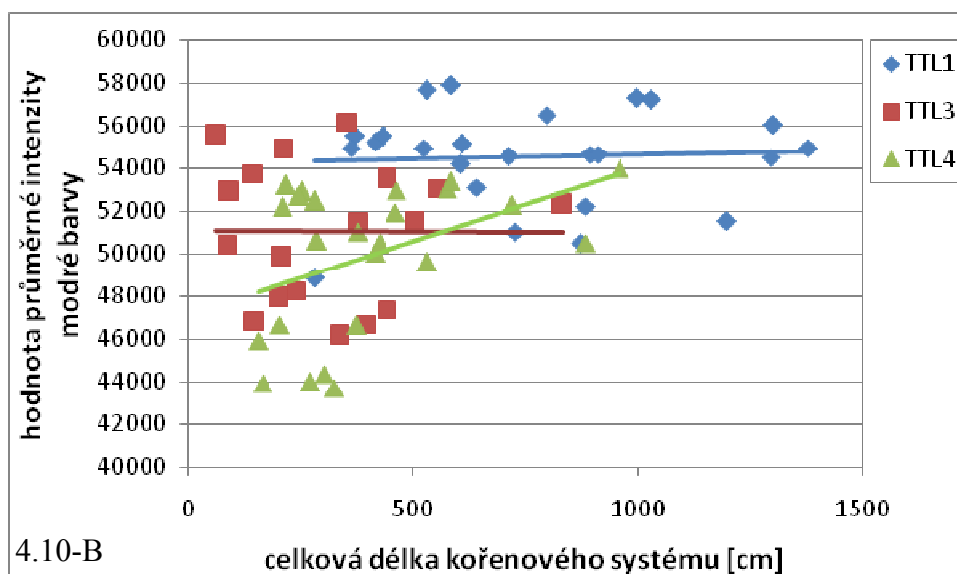
#### 4.3.2.4. Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotami analýzy exprese GUS

Podobně jako v případě vodní kultury 2 (VK2) byl pozorován trend negativní korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a procentuálním zastoupením oblastí s detekovatelnou aktivitou GUS (grafy č. 4.10). Statisticky průkazná je však tato korelace pouze u rostlin *TTL3::uidA* - linii 30 (Spearmanův korelační koeficient = -0,676,  $p = 0,00207$ ). U rostlin *TTL1::uidA* - linii 83 (Spearmanův korelační koeficient = -0,368,  $p = 0,0770$ ) ani *TTL4::uidA* - linii 43 (Spearmanův korelační koeficient = -0,253,  $p = 0,233$ ) není korelace statisticky průkazná.

Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotou průměrné modré nebyla statisticky prokázána ani u jedné z rostlinných linií: *TTL1::uidA* - linii 83 (Spearmanův korelační koeficient = -0,0670,  $p = 0,756$ ), *TTL3::uidA* - linii 30 (Spearmanův korelační koeficient = -0,0877,  $p = 0,729$ ), *TTL4::uidA* - linii 43 (Spearmanův korelační koeficient = 0,377,  $p = 0,0698$ ). Přesto u rostlin *TTL4::uidA* - linii 43 můžeme pozorovat slabý trend pozitivní korelace mezi zmíněnými parametry, který však není statisticky průkazný (grafy č. 4.10).

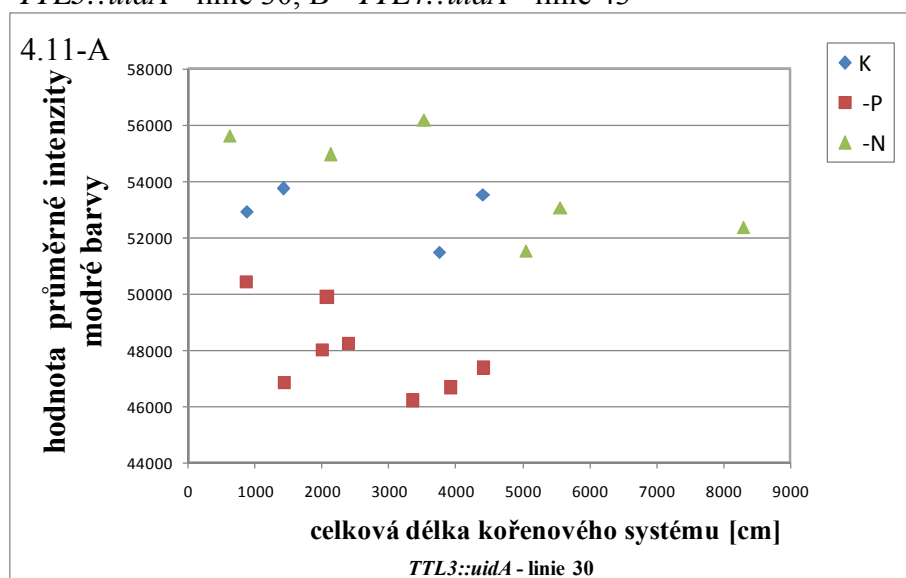
**Grafy č. 4.10:** Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotami analýzy exprese GUS (A – korelace mezi procentuálním zastoupením oblastí s GUS aktivitou a celkovou délkou kořenového systému, B – korelace mezi hodnotou průměrné intenzity modré barvy a celkovou délkou kořenového systému)

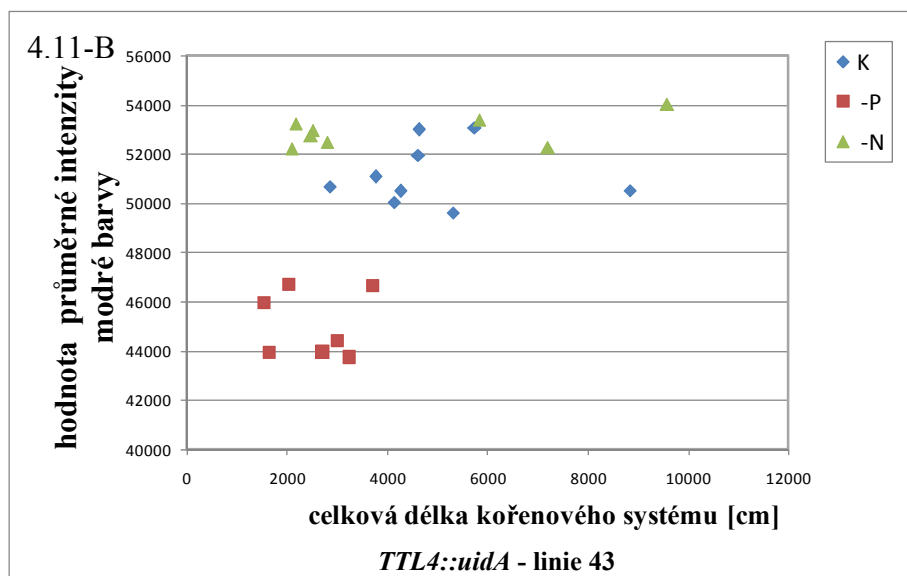




Z porovnání hodnot průměrné intenzity modré barvy a celkové délce kořenového systému rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 i *TTL4::uidA* - linii 43 vyplývá, že rostliny trpící nedostatkem fosforu vykazují nižší hodnotu průměrné intenzity modré barvy ve srovnání se stejně velkými rostlinami trpícími nedostatkem dusíku (grafy č. 4.11).

**Grafy č. 4.11:** Vztah mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotou průměrné intenzity modré barvy v závislosti na variantě výživy pro rostliny A – *TTL3::uidA* - linie 30, B - *TTL4::uidA* - linie 43





#### 4.3.2.5. Analýza aktivity promotoru na mikroskopické úrovni

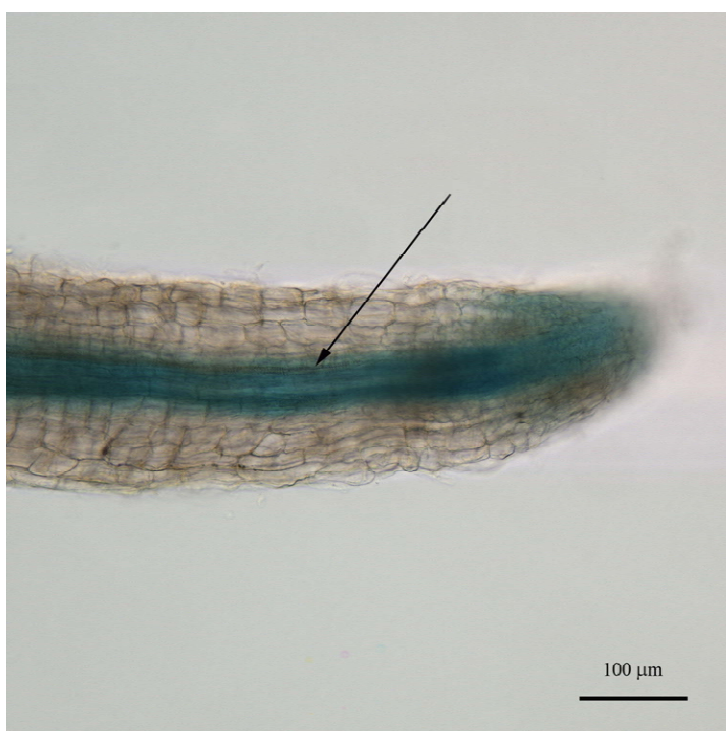
##### *TTL1::uidA (GUS)* - linie 83

U rostlin *TTL1::uidA* - linie 83 pěstovaných v kontrolním médiu můžeme pozorovat aktivitu promotoru genu *TTL1* nejen v hlavním kořeni ale i v různých fázích vývoje postranních kořenů (obr. č. 4.10). V hlavním kořeni je patrná v oblasti středního válce a také v povrchových vrstvách špičky, zejména oblasti protodermu a laterální kořenové čepičky. Promotor tohoto genu je aktivní i v pozdějších fázích vývoje primordií postranních kořenů v celém jejich objemu. U krátkých PK, časně po jejich vynoření, je patrné modré zabarvení ve středním válci po celé délce PK a opět v povrchových vrstvách špičky – laterální kořenová čepička a protoderm. Stejně je lokalizována aktivita promotoru genu *TTL1* i u delších PK, jen s tím rozdílem, že v kratších PK je intenzivnější zabarvení.

Rostliny vystavené sníženému obsahu fosforu vykazovaly aktivitu promotoru pro gen *TTL1* v primordiích postranních kořenů a středním válci hlavního kořene, podobně jako v případě kontrolních rostlin. U PK těsně po vynoření nacházíme expresi reportérového genu ve středním válci dále za špičkou PK, nejintenzivněji především v bazální části PK, opět zde není patrná lokalizace v povrchových strukturách. Oproti kontrolním a N-deficientním rostlinám není přítomná exprese ve špičce postranních kořenů těsně po vynoření. I v případě dlouhých PK je exprese patrná ve středním válci. Intenzita modrého zabarvení sílí i zde při bázi PK. Byly však pozorovány i PK, jež při bázi žádnou expresi nevykazovaly (obr. č. 4.10).

Rostliny trpící nedostatkem dusíku vykazovaly v hlavním kořeni expresi GUS v povrchových vrstvách špičky, výrazně především v oblasti laterální kořenové čepičky. Oproti kontrolním a P-deficientním rostlinám je nicméně možno zaznamenat odlišnosti v lokalizaci

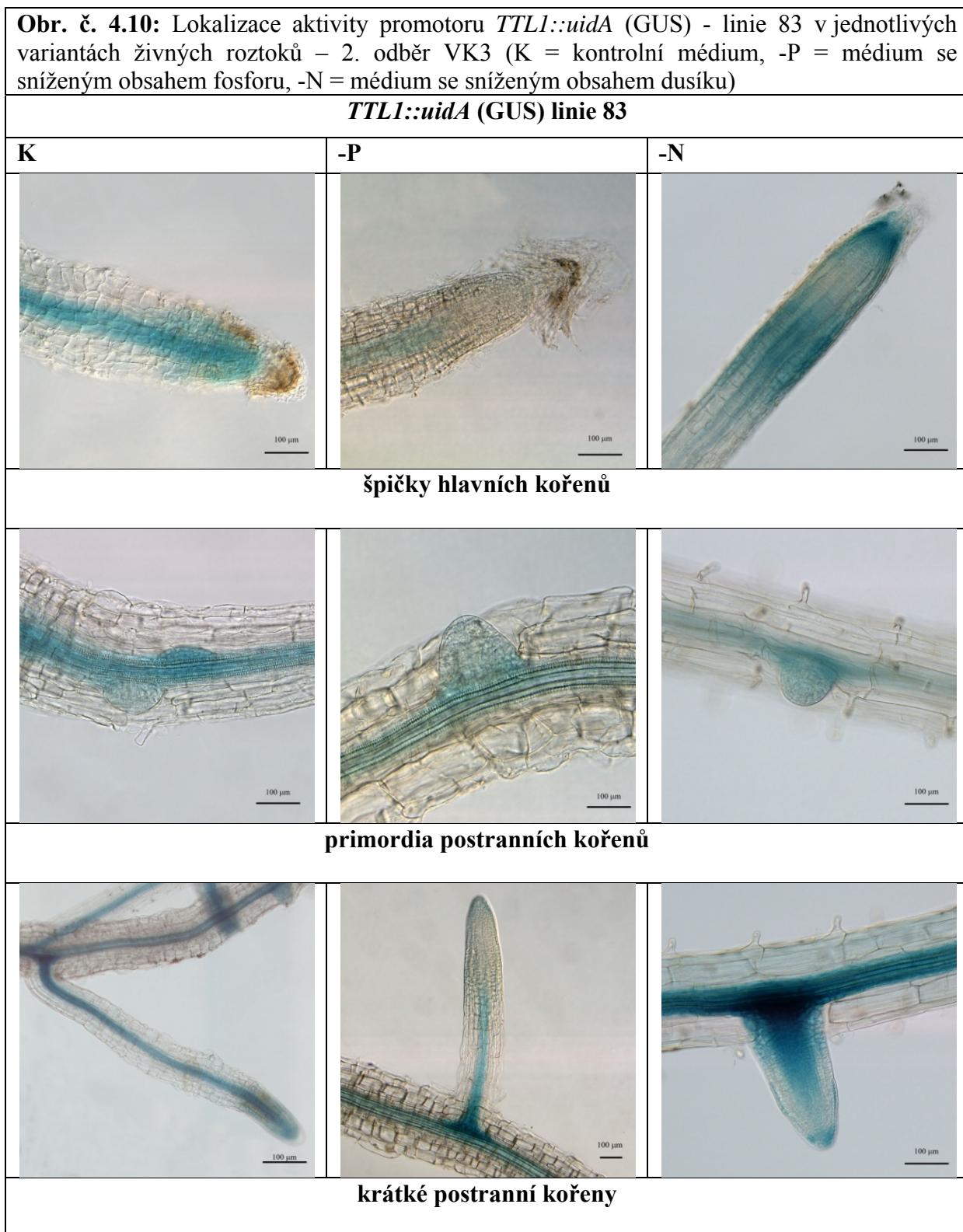
aktivity v oblasti apexu hlavního kořene, především výraznější aktivitu v oblasti elongační zóny. Tyto rozdíly zřejmě souvisí s intenzivnějším růstem hlavního kořene u N-deficientních rostlin (viz následující odstavec). Za elongační zónou aktivita promotoru v hlavním kořeni výrazně slábne, ale opět se objevuje v oblasti tvorby vodivých pletiv, lokalizovaná ve středním válci. Exprese pokračuje až k samotné bázi hlavního kořene. Lokalizace exprese reportérového genu v různých fázích vývoje PK je shodná s lokalizací u rostlin pěstovaných v kontrolním mediu (obr. č. 4.10), pouze u velmi dlouhých PK jsou patrné podobné rozdíly v lokalizaci aktivity v oblasti apikálního meristému jako v apexu hlavního kořene. I zde se totiž zřejmě projevuje rozdílná intenzita růstu v jednotlivých variantách výživy.



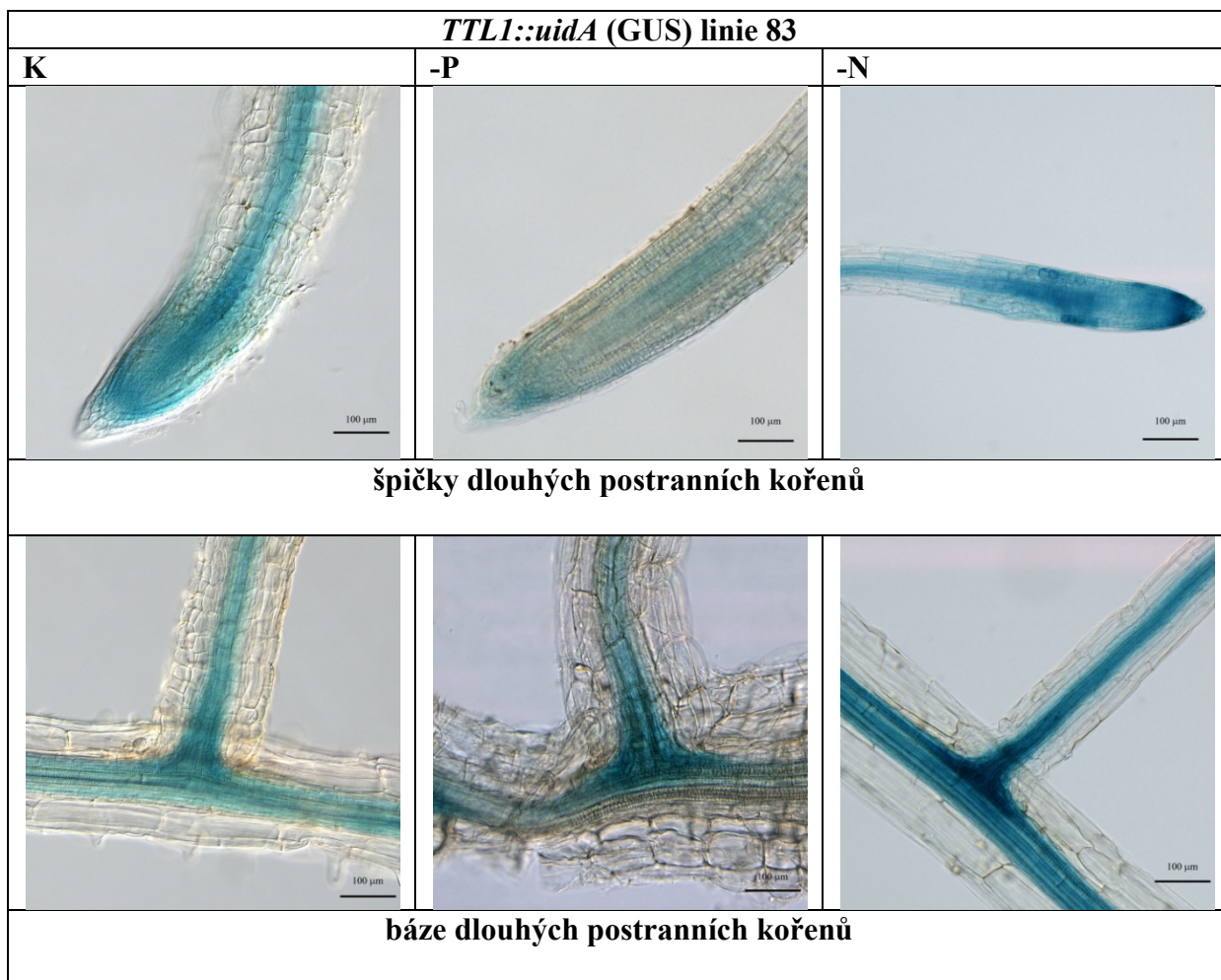
**Obr. č. 4.9:** Diferenciace xylému v blízkosti špičky hlavního kořene rostliny *TTL1::uidA* - linie 83, pěstované v mediu se sníženým obsahem fosforu. Šipka označuje pozici viditelných xylémových elementů.

U P-deficientních rostlin byla pozorována diferenciace xylému výrazně blíže špičce hlavního kořene než u rostlin vystavených sníženému obsahu dusíku, což naznačuje terminaci aktivity apikálního meristému a postupné zastavení růstu osy hlavního kořene u P-deficientních rostlin (obr. č. 4.9). K částečné terminaci aktivity apikálního meristému hlavního kořene nicméně došlo zřejmě také v kontrolním mediu, což naznačuje stav apikálního meristému hlavního kořene na mikroskopických snímcích (obr. č. 4.10). Tuto skutečnost dále potvrzují také podobné délky osy hlavního kořene zaznamenané v kontrolní a P-deficientní variantě (graf č. 4.8-B). Počínající terminace aktivity meristému hlavního kořene v kontrolní variantě může souviset s přechodem rostlin do generativní fáze, protože v době odběru rostliny již tvořily poupata. Naproti tomu hlavní kořen N-deficientních rostlin se

v době odběru rostlin nacházel ve stavu intenzivního růstu, což naznačuje větší celková délka hlavního kořene oproti ostatním variantám i stav apikálního meristému, kde nejsou patrné známky terminace aktivity. Podobné rozdíly mezi variantami výživy byly zaznamenány i v případě apikálního meristému dlouhých postranních kořenů.







### *TTL3::uidA* (GUS) - linie 30

V hlavním kořeni rostliny *TTL3::uidA* - linie 30 pěstovaných v kontrolním médiu nedochází k expresi reportérového genu pro GUS v kořenové čepičce (obr. č. 4.12). Expresi však zaznamenáváme v povrchových vrstvách špičky, především v laterální kořenové čepičce, a v elongační zóně. Slabou expresi je dále možno zaznamenat v povrchových strukturách (rhizodermis/primární kůra), která se směrem k bázi postupně vytrácí. Velmi silnou aktivitu dále pozorujeme v různých fázích vývoje PK. Aktivitu promotoru můžeme pozorovat již v pozdější fázi vývoje primordia, a to po celém jeho objemu. V nedávno vynořených PK pozorujeme aktivitu lokalizovanou v povrchových strukturách a to po celé ploše. U dlouhých (starších) PK se lokalizace mění, již není lokalizována po celé délce PK, ale zůstává pouze v oblasti špičky PK (především v oblasti laterální kořenové čepičky, ne však v oblasti kolumely a apikální části kořenové čepičky) a pokračuje až do oblasti elongační zóny, kde postupně mizí. Při bázi dlouhých PK je pak patrná jen velmi slabá aktivita ve středním válci, v místě napojení PK na mateřský kořen.


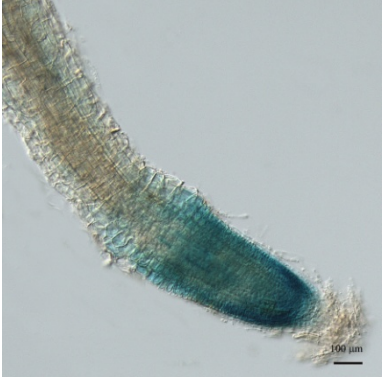


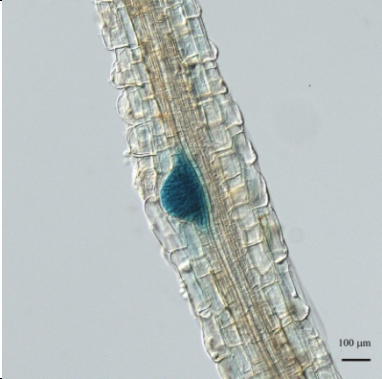
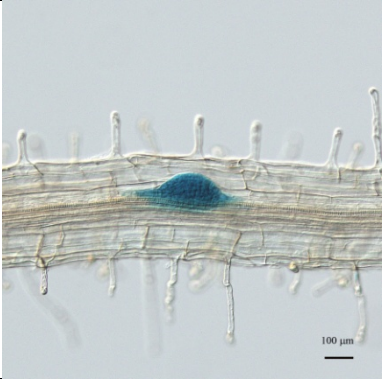



Obdobnou expresi v hlavním kořeni mají, stejně jako rostliny pěstované v kontrolním médiu, i rostliny trpící nedostatkem fosforu (obr. č. 4.12). I u nich nacházíme expresi ve špičce hlavního kořene (nejintenzivnější je v oblasti apikálního meristému), nikoliv však v kořenové čepičce. Aktivita také pokračuje k elongační zóně, kde mizí. Promotor genu *TTL3* je aktivní i u těchto rostlin v pozdních fázích vývoje primordia. Aktivita promotoru je v malých PK stejná jako u rostlin pěstovaných v kontrolním roztoku. U delších postranních kořenů zůstává lokalizována v oblasti špičky až po elongační zónu, kde mizí. Objevuje se pak v povrchových strukturách (rhizodermis/primární kůra) při bázi PK, u velmi dlouhých PK však zůstává pouze v oblasti špičky. Celkově lze říci, že u rostlin trpících nedostatkem fosforu je ze všech variant intenzita modré barvy největší, což koresponduje i s naměřenými hodnotami.

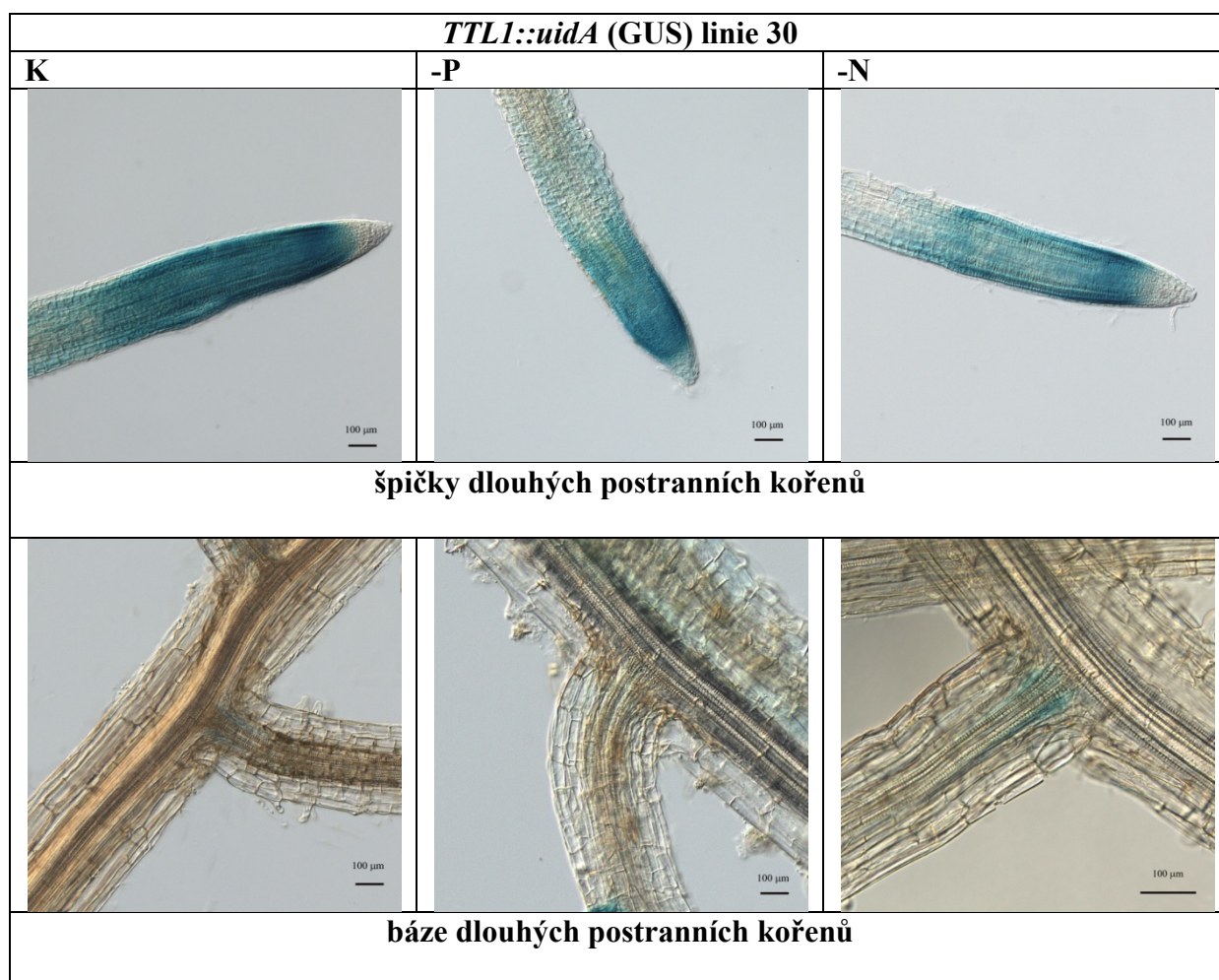
**Obr. č. 4.11:** Porovnání lokalizace aktivity promotoru v oblasti báze PK. Vlevo rostlina pěstovaná v kontrolním roztoku, vpravo rostlina trpící nedostatkem dusíku.



U N-deficientních rostlin nebyla pozorována změna v intenzitě a lokalizaci barvení indikujícího aktivitu promotoru *TTL3* oproti rostlinám kontrolním (obr. č. 4.12). Rozdíl je patrný jen u středně dlouhých PK. U rostlin kontrolních i trpících nedostatkem dusíku je exprese přítomná v povrchových strukturách špičky, v elongační zóně mizí a objevuje se znovu až při bázi. Ale u rostlin trpících dusíkem je promotor aktivní jen ve velmi malé oblasti. U kontrolních rostlin lze pozorovat aktivitu promotoru ve větší vzdálenosti před bázi PK. Navíc u N-deficientních rostlin není aktivita patrná v celé šíři kořene, ale pouze v oblasti kolem středního válce (obr. č. 4.11). V případě starších delších PK je exprese v obou případech při bázi velmi slabá a na malé ploše.



<b>Obr. č. 4.12:</b> Lokalizace aktivity promotoru <i>TTL3::uidA</i> (GUS) - linie 30 v jednotlivých variantách živných roztoků – 2. odběr VK3 (K = kontrolní médium, -P = médium se sníženým obsahem fosforu, -N = médium se sníženým obsahem dusíku)		
<b><i>TTL3::uidA</i> (GUS) linie 30</b>		
<b>K</b>	<b>-P</b>	<b>-N</b>
		
<b>špičky hlavních kořenů</b>		
		
<b>primordia postranních kořenů</b>		
		
<b>krátké postranní kořeny</b>		



#### *TTL4::uidA* (GUS) - linie 43

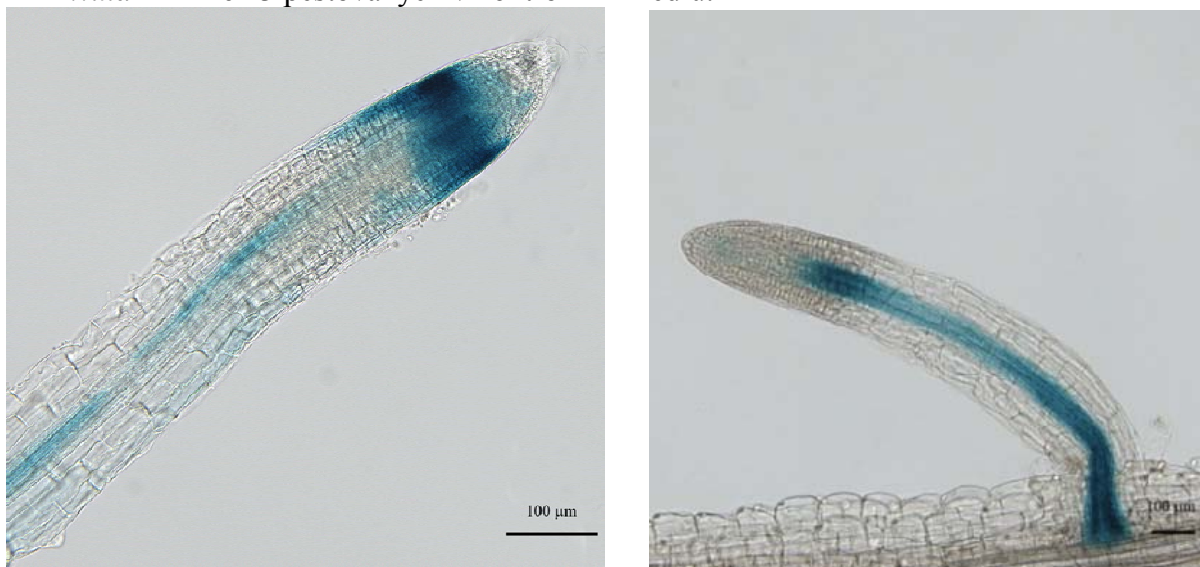
V hlavním kořeni rostlin *TTL4::uidA* - linie 43 pěstovaných v kontrolním živném roztoku nebyla exprese reportérového genu GUS pozorována buď vůbec, nebo byla lokalizována v nesouvislých oblastech v oblasti špičky a počátku elongační zóny (obr. č. 4.14). V primordiích postranních kořenů těsně před vynořením z mateřského kořene byla však již exprese běžně pozorována. U PK po vynoření byl promotor pro gen *TTL4* aktivní ve středním válci od oblasti elongační zóny až po oblast báze PK. U některých rostlin se pak ještě v rámci těchto krátkých PK nalézala aktivita v oblasti špičky, která vykazovala určitou variabilitu – u některých PK byla pozorována aktivita v oblasti kolumely, ne však v klidovém centru a proximální části meristému, v jiných byla naopak přítomna v povrchových vrstvách meristému (obr. č. 4.13). Dlouhé PK se vyznačovaly aktivitou pouze ve středním válci při bázi PK.

Rostliny pěstované v roztoku se sníženým obsahem fosforu se od rostlin kontrolních a N-deficientních lišily především lokalizací velmi intenzivní aktivity promotoru v oblasti

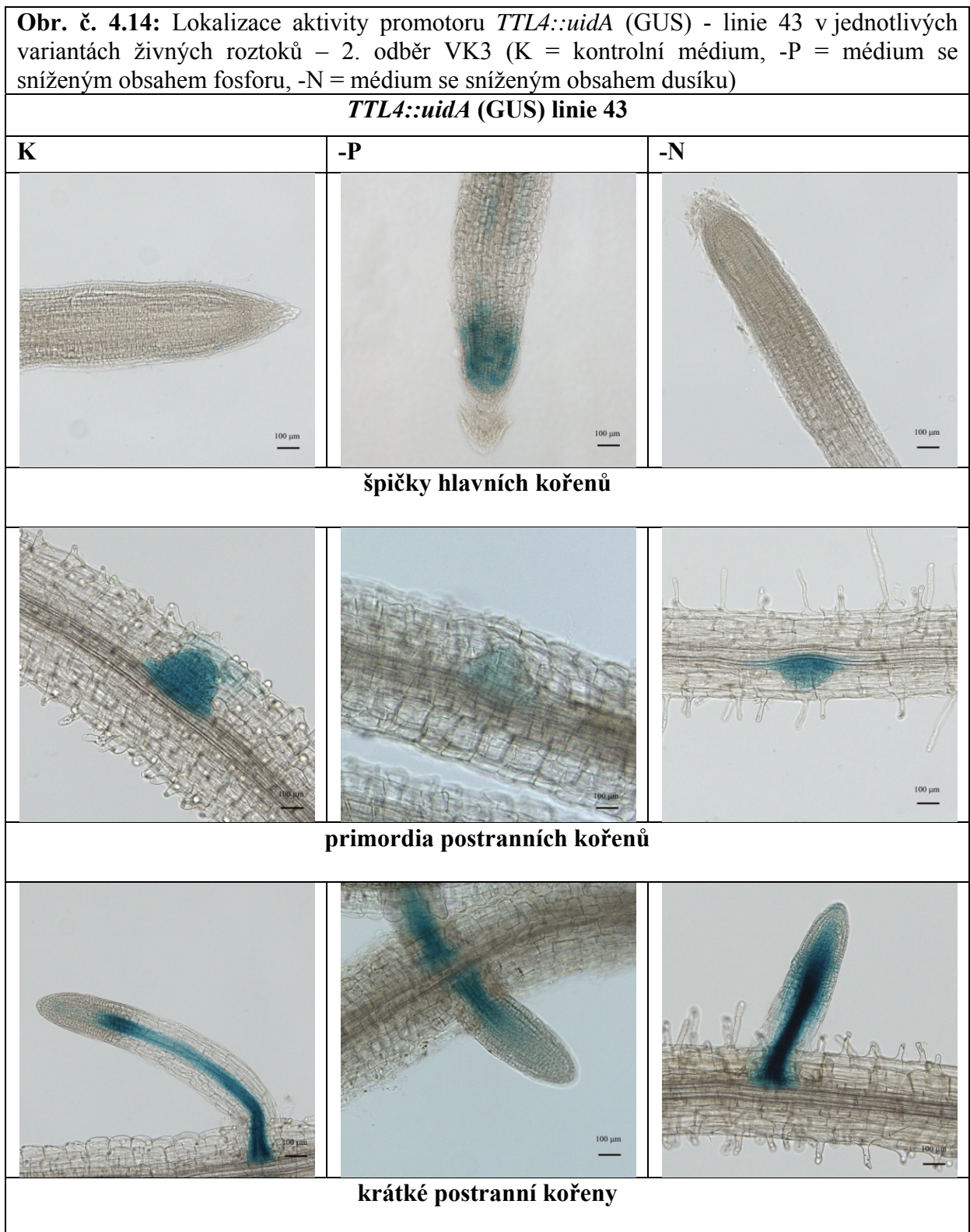
apikálního meristému hlavního kořene i delších postranních kořenů. Tento fakt, zřejmě podobně jako u ostatních kultivovaných linií korespondoval s viditelnou terminací aktivity apikálního meristému a poklesem rychlosti růstu těchto kořenů u P-deficientních rostlin. V ostatních částech kořenového systému (primordiích postranních kořenů, kratších PK i středním válci bazálních částí PK) se lokalizace shodovala s kontrolními rostlinami.

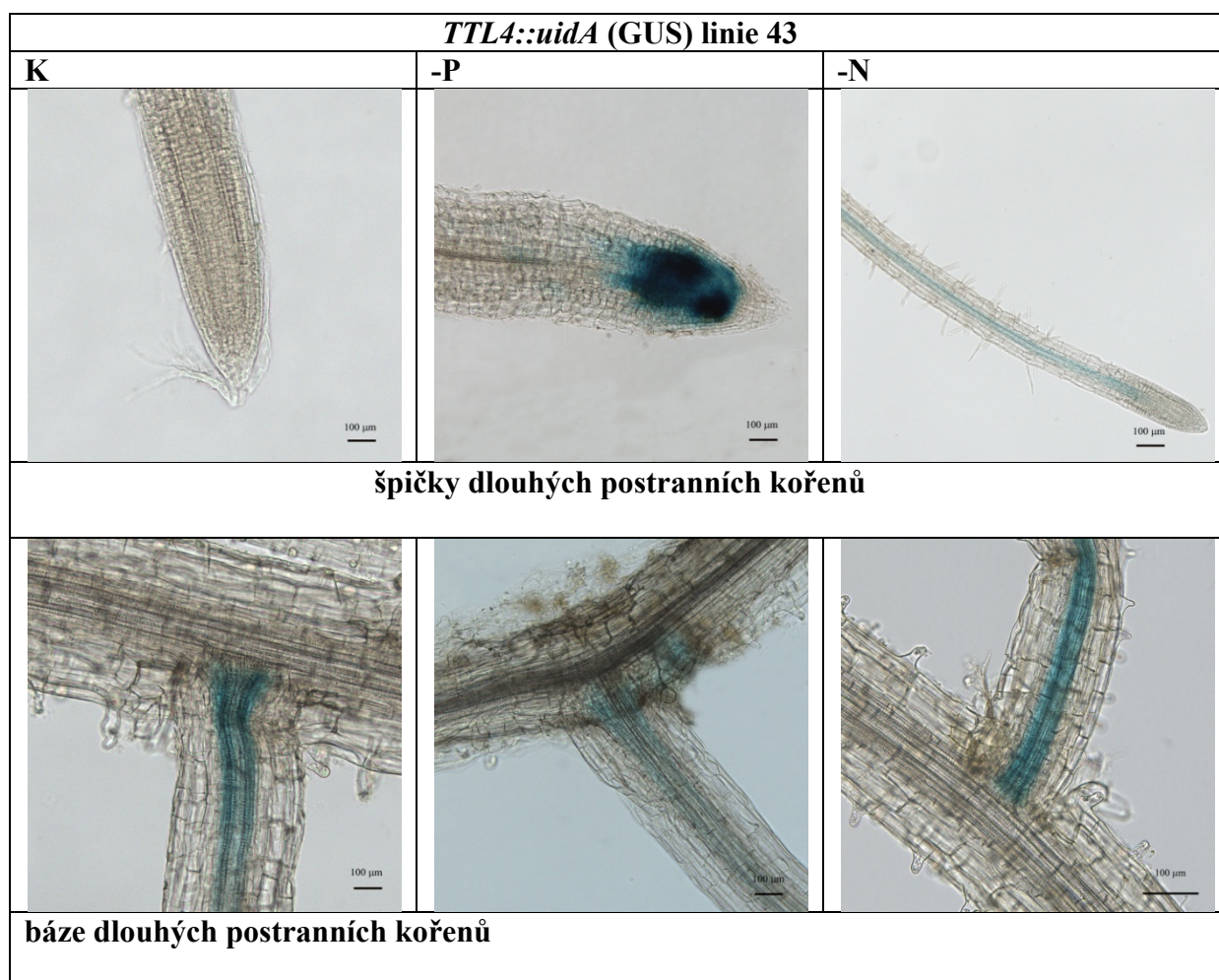
Rostliny trpící nedostatkem dusíku nevykazovaly aktivitu promotoru pro gen *TTL4* v hlavním kořeni. Aktivita promotoru v primordiích, krátkých i dlouhých PK se shodovala s kontrolními rostlinami. Ačkoliv intenzita modré barvy malých PK se u rostlin trpících nedostatkem dusíku jevila větší než u rostlin kontrolních (obr. č. 4.14).

**Obr. č. 4.13:** Variabilita lokalizace aktivity promotoru *TTL4* ve špičce kratších PK rostlin *TTL4::uidA* - linie 43 pěstovaných v kontrolním mediu.









## 4.4. Růst netransformovaných rostlin

Kontrolní rostliny divokého genotypu (*Arabidopsis thaliana* Col 0) byly pěstovány pro porovnání s růstem transformovaných linií a byly sklizeny ve stejném stáří. Během růstu byly vystaveny stejným kultivačním podmínkám – 13 dní byly pěstovány v kontrolním mediu a následně 6 dní ve variantách výživy.

### 4.4.1. Analýza nadzemní části rostlin

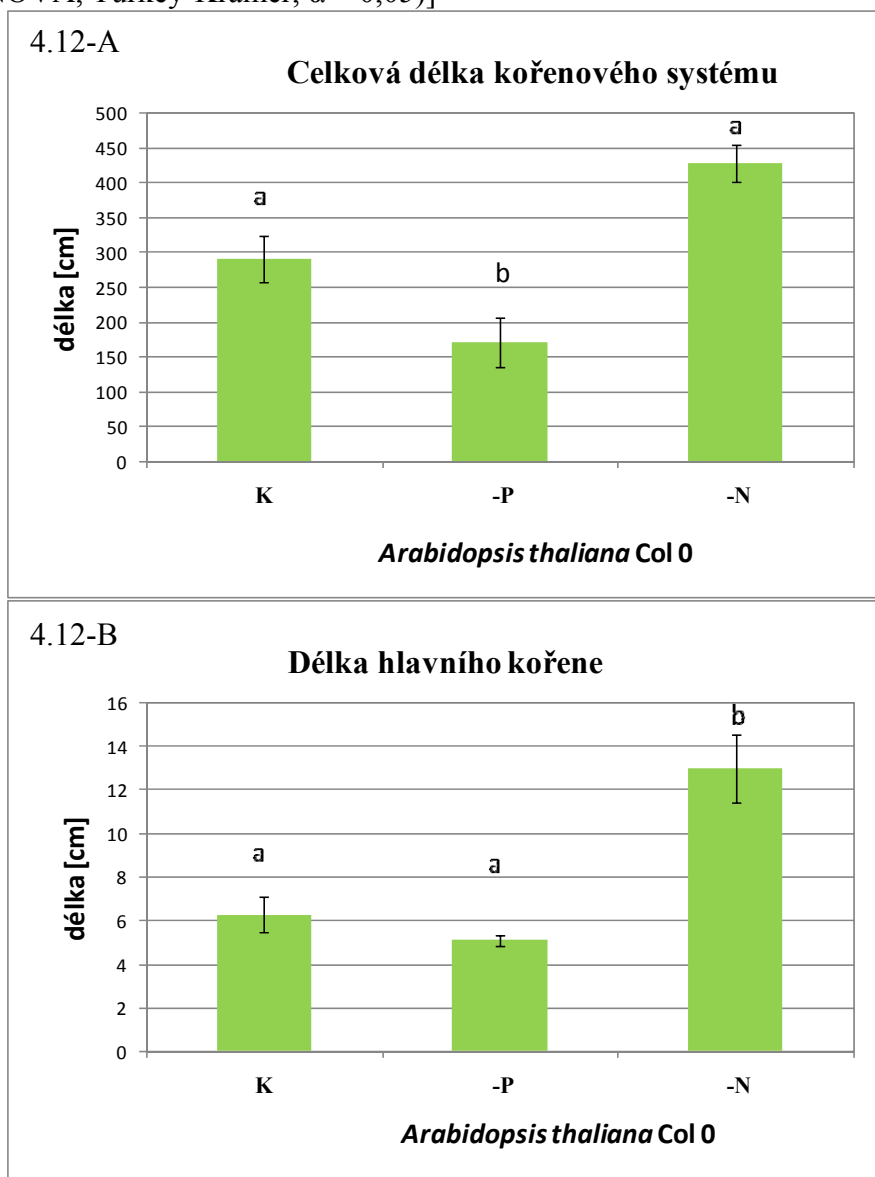
V hodnotě charakterizující velikost nadzemní části rostliny, plocha průmětu listové růžice, se rostliny z jednotlivých variant výživy nelišily (grafy č. 4.12, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ). Z naměřených hodnot je patrný trend ukazující, že rostliny trpící nedostatkem jednoho z makroprvků mají menší nadzemní část.

#### 4.4.2. Architektura kořenového systému

Rostliny pěstované v živném roztoku se sníženým obsahem fosforu měly statisticky prokazatelně menší celkovou délku kořenového systému než rostliny pěstované v kontrolním médiu nebo médiu se sníženým obsahem dusíku. Nejdelší hlavní kořen a kořeny postranní měly rostliny trpící nedostatkem dusíku. V počtu PK se rostliny rostoucí v různých živných roztocích nelišily (grafy č. 4.12, One-Way ANOVA, Tukey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ ).

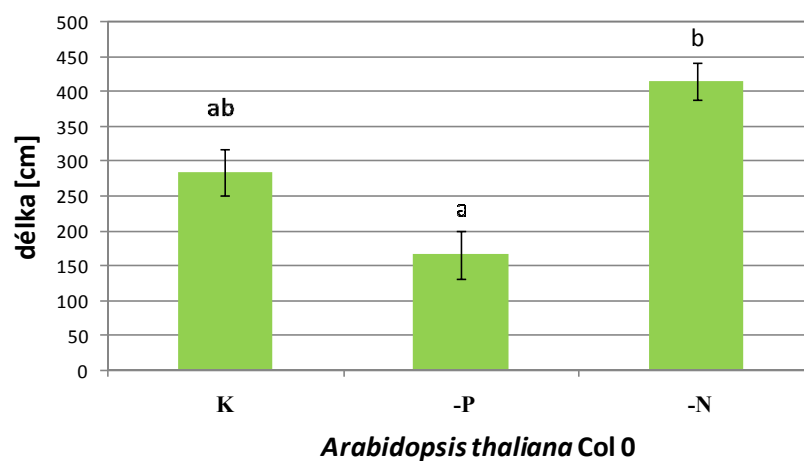
**Graf č. 4.12:** Charakteristika kořenového systému a nadzemní části rostlin *Arabidopsis thaliana* Col 0

A - celková délka kořenového systému, B - délka hlavního kořene, C - délka PK, D - počet PK, E – plocha průmětu listových růžic [průměrné hodnoty  $\pm$  SE,  $n = 4-5$ , rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi variantami v rámci jedné linie (One-Way ANOVA, Turkey-Kramer,  $\alpha = 0,05$ )]



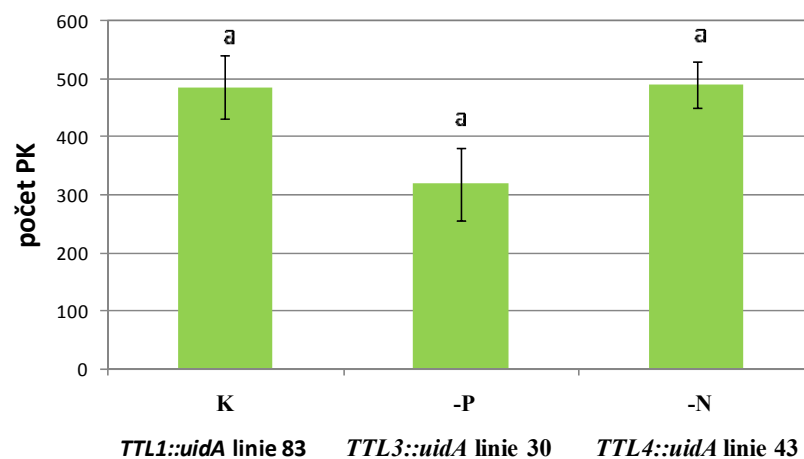
4.12-C

### Délka postranních kořenů



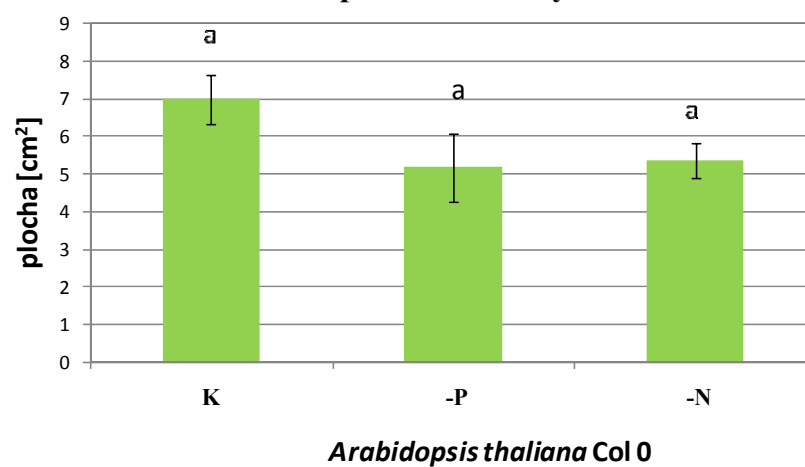
4.12-D

### Počet postranních kořenů



4.12-E

### Plocha průmětu listových růžic



## 4.5. IV1 (kultivace *in vitro* č. 1)

### 4.5.1. Architektura kořenového systému

U rostlin *TTL3::uidA* linie 30 nebyla statisticky prokázána závislost celkové délky kořenového systému v závislosti na složení živného roztoku, ačkoliv ze získaných dat je patrný trend, kdy rostliny pěstované v kontrolním mediu mají nejdelší kořenový systém, nejmenší pak mají rostliny trpící nedostatkem fosforu. Stejná situace je i případě délky a počtu PK (grafy č. 4.13, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ). Rostliny pěstované v mediu se sníženým obsahem fosforu měly signifikantně kratší hlavní kořen ve srovnání s KR (grafy č. 4.13, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ).

Protože rostliny jedné varianty byly vždy kultivovány ve dvou miskách s agarovým mediem, byl testován také vliv tohoto experimentálního uspořádání pomocí hierarchické (nested) anovy. Rozdílné plotny neměly vliv na počet postranních kořenů ( $F = 2,02$ ,  $p = 0,149$ ). Ostatní faktory byly odlišnými plotnami ovlivněny: celková délka kořenového systému ( $F = 3,67$ ,  $p = 0,0332$ ), délka hlavního kořene ( $F = 3,35$ ,  $p = 0,0361$ ), délka PK ( $F = 3,20$ ,  $p = 0,0498$ ) (Nested-GLM ANOVA).

Rostliny *TTL4::uidA* linie 43 trpící nedostatkem fosforu měly oproti rostlinám kontrolním prokazatelně menší kořenový systém, tedy i kratší hlavní kořena nižší hodnotu délky a počtu PK (grafy č. 4.13, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ). V případě této linie nebyl prokázán vliv odlišné plotny ani na jeden ze sledovaných parametrů: celková délka kořenového systému ( $F = 1,30$ ,  $p = 0,299$ ), délka hlavního kořene ( $F = 1,83$ ,  $p = 0,172$ ), délka PK ( $F = 1,35$ ,  $p = 0,283$ ), počet PK ( $F = 0,96$ ,  $p = 0,427$ ) (Nested-GLM ANOVA).

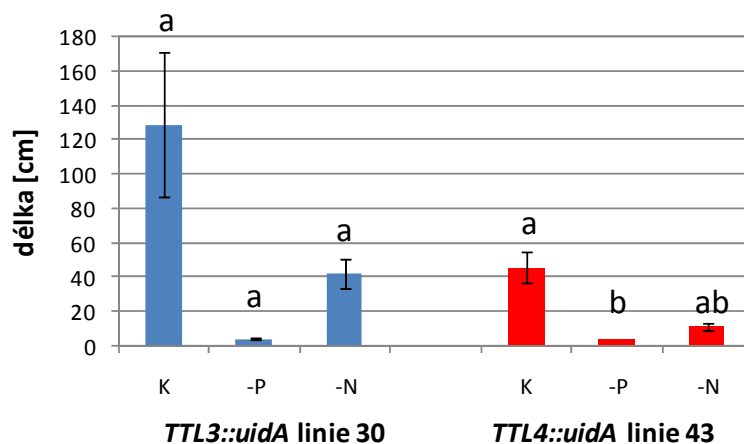


**Graf č. 4.13:** Charakteristika kořenového systému rostlin

A - celková délka kořenového systému, B - délka hlavního kořene, C - délka PK, D - počet PK [průměrné hodnoty  $\pm$  SE,  $n = 6-10$ , rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi variantami v rámci jedné linie (Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ )]

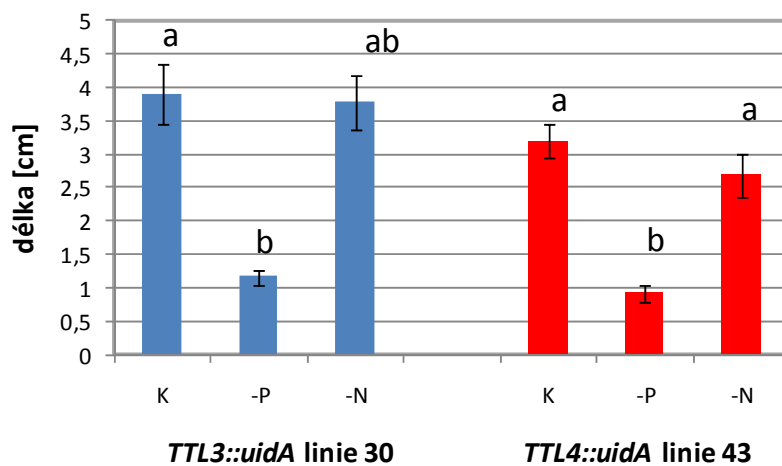
4.13-A

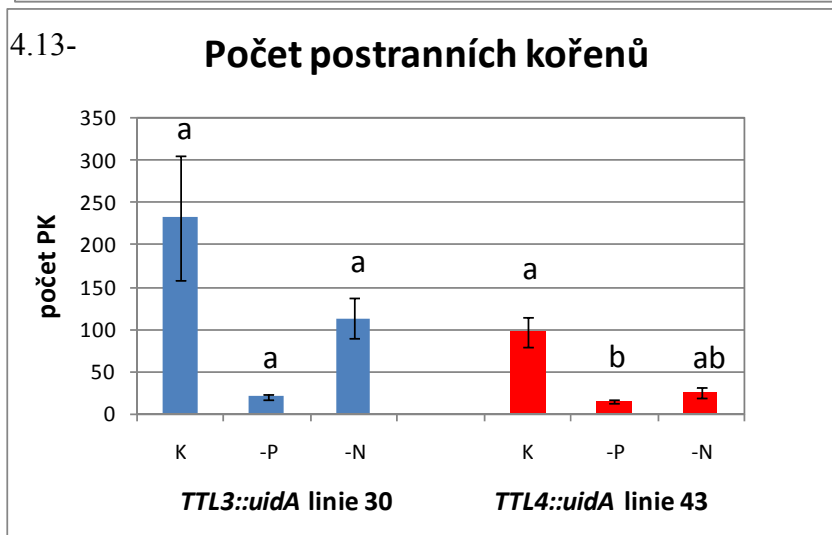
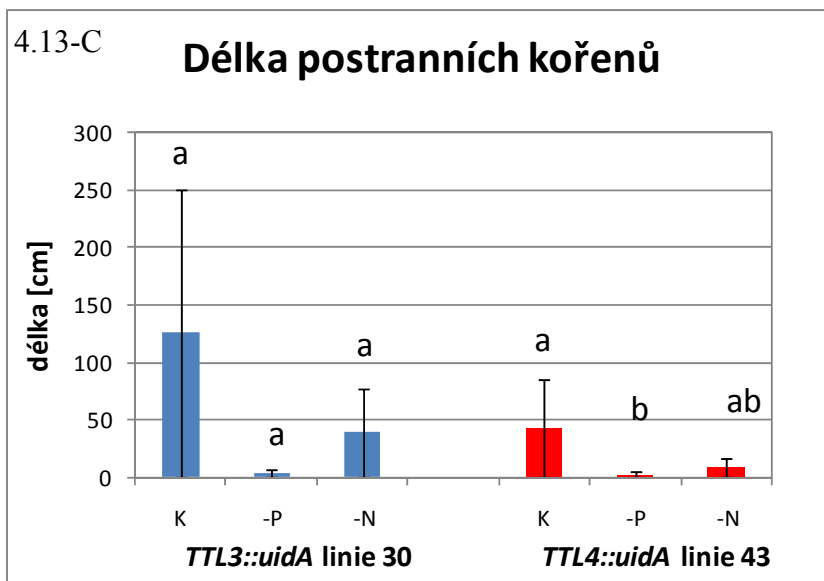
### Celková délka kořenového systému



4.13-B

### Délka hlavního kořene





#### 4.5.2. Analýza aktivity promotoru

U rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 nebyl prokázán statistický rozdíl v rámci procentuálního zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene. Z naměřených dat je patrné, že u rostlin trpících nedostatkem fosforu byla plocha s detekovatelnou GUS aktivitou zastoupena v menším množství. Nejnižší průměrnou intenzitu modré barvy z pěstovaných variant vykazovaly rostliny pěstované na substrátu s nižší dostupností fosforu, plochy s detekovanou aktivitou GUS byly tedy v této variantě tmavší (grafy č. 4.14, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ). Vliv plotny byl prokázán pouze u procentuálního zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou ( $F = 13,23$ ,  $p = 0,000343$ ) (Nested-GLM ANOVA).

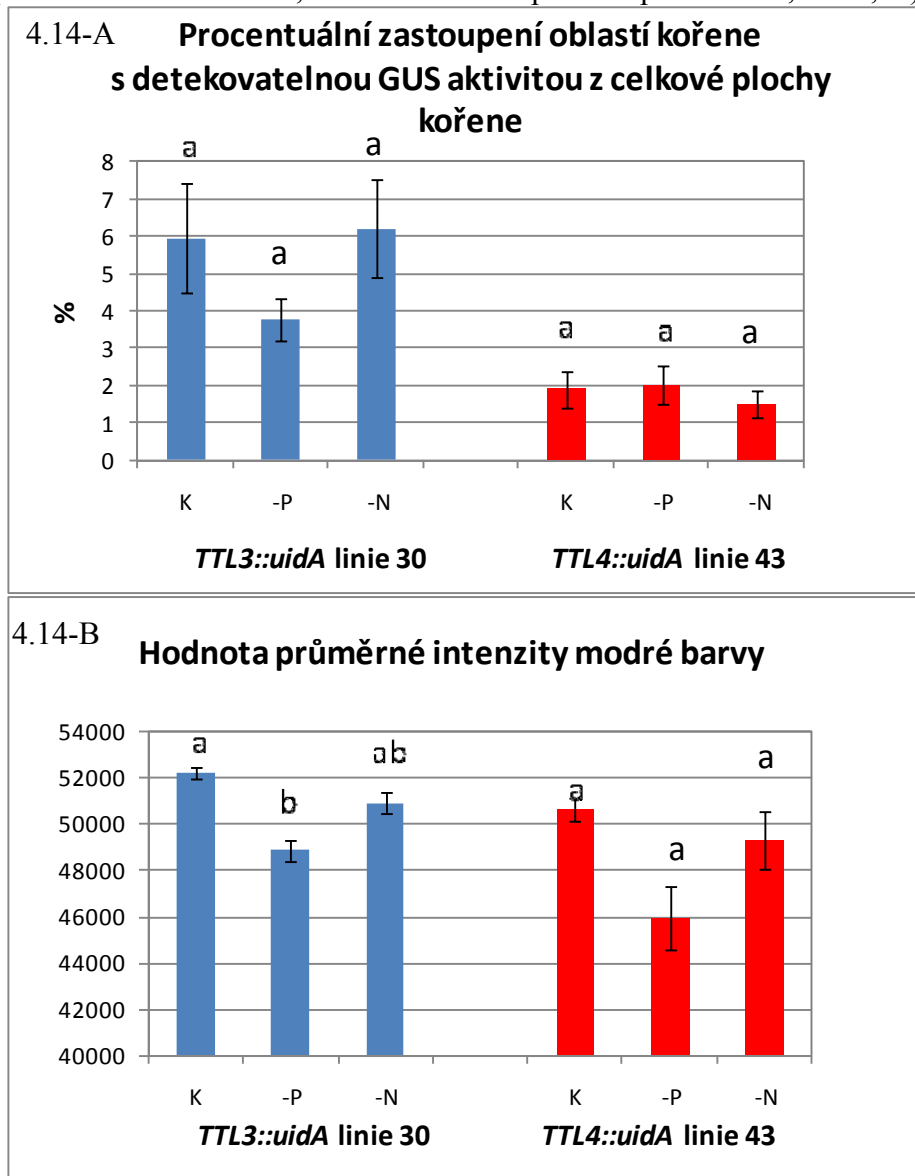
Jednotlivé varianty rostlin *TTL4::uidA* linie 43 se statisticky nelišily ani v jedné hodnotě charakterizující aktivitu promotoru (grafy č. 4.14, Nested-GLM ANOVA, Bonferroni

Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ ). Přesto je patrný trend nižší průměrné intenzity modré barvy u rostlin trpících nedostatkem fosforu. Podobný trend byl u rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 statisticky potvrzen. Vliv plotny nebyl prokázán ani u jednoho z parametrů: procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene ( $F = 0,32$ ,  $p = 0,813$ ), hodnota průměrné intenzity modré barvy ( $F = 0,86$ ,  $p = 0,477$ ) (Nested-GLM ANOVA).

**Grafy č. 4.14:** Charakteristika aktivity promotoru

A - procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořene, B - hodnota průměrné intenzity modré barvy

[průměrné hodnoty  $\pm$  SE,  $n = 6-10$ , rozdílná písmena nad sloupci ukazují statisticky prokazatelné rozdíly mezi variantami v rámci jedné linie (Nested-GLM ANOVA, Bonferroni Multiple Comparison test,  $\alpha = 0,05$ )]



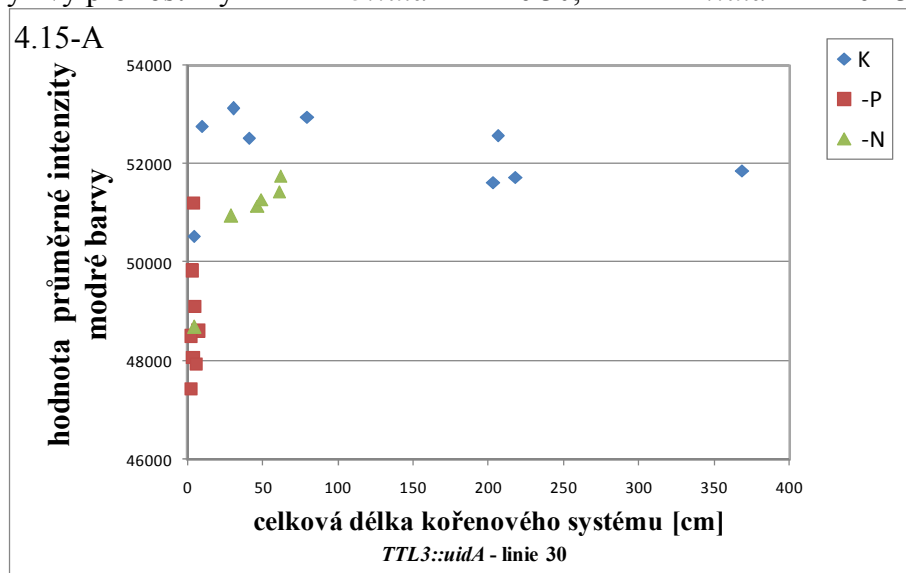
### 4.5.3. Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotami analýzy exprese GUS

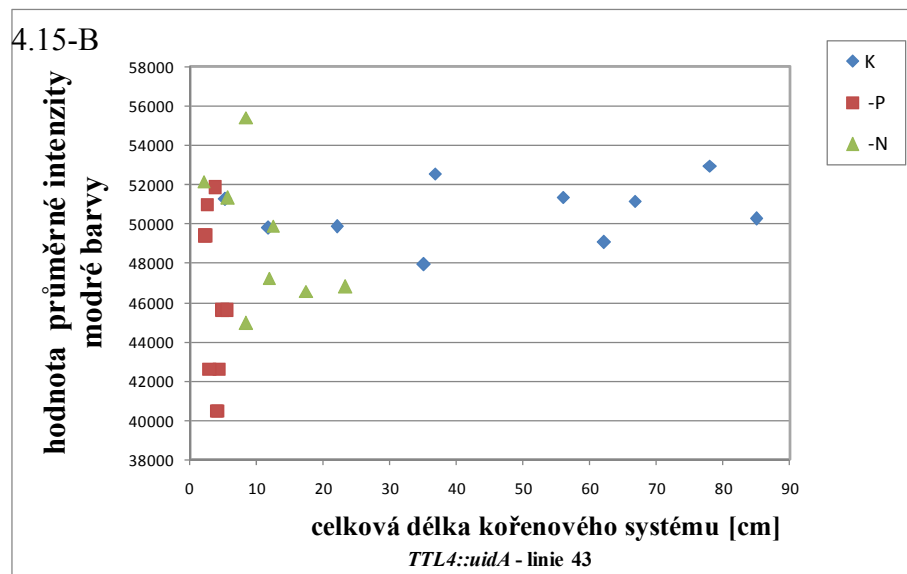
Korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotou průměrné intenzity modré barvy byla prokázána pouze u rostlin *TTL3::uidA* - linii 30 (Spearmanův korelační koeficient = 0,744,  $p = 0,000047$ ), kdy se zvětšující se velikostí plochou kořenového systému roste hodnota průměrné intenzity modré barvy, modrá barva je tedy světlejší.

U rostlin *TTL3::uidA* - linii 30 (Spearmanův korelační koeficient = -0,263,  $p = 0,226$ ) ani *TTL4::uidA* - linii 43 (Spearmanův korelační koeficient = -0,0986,  $p = 0,618$ ) nebyla korelace mezi celkovou délkou kořenového systému a procentuálním zastoupením oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy prokázána.

Rostliny *TTL4::uidA* - linii 43 trpící nedostatkem fosforu ve srovnání se stejně velkými rostlinami, které jsou vystaveny nedostatku dusíku, vykazovaly nižší hodnotu průměrné intenzity modré barvy. U rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 ji ž tento trend není tolik patrný (graf č. 4.15).

**Graf č. 4.15:** Vztah mezi celkovou délkou kořenového systému a hodnotou průměrné intenzity modré barvy v závislosti na variantě výživy pro rostliny A – *TTL3::uidA* - linie 30, B - *TTL4::uidA* - linie 43





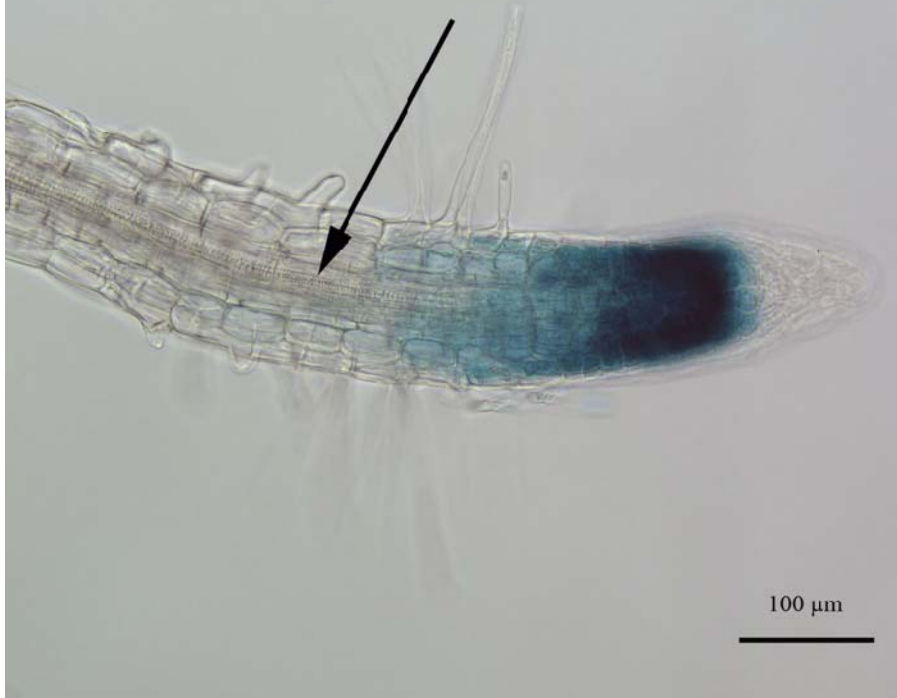
#### 4.5.4. Mikroskopické pozorování

U rostlin *TTL4::uidA* - linie 43 pěstovaných při nedostatku fosforu byla pozorována diferenciace xylému a tvorba kořenových vlásků velmi blízko špičky hlavního kořene i kořenů postranních. Velmi podobný stupeň diferenciace byl pozorován i v případě rostlin trpících nedostatkem dusíku (obr. č. 4.15)

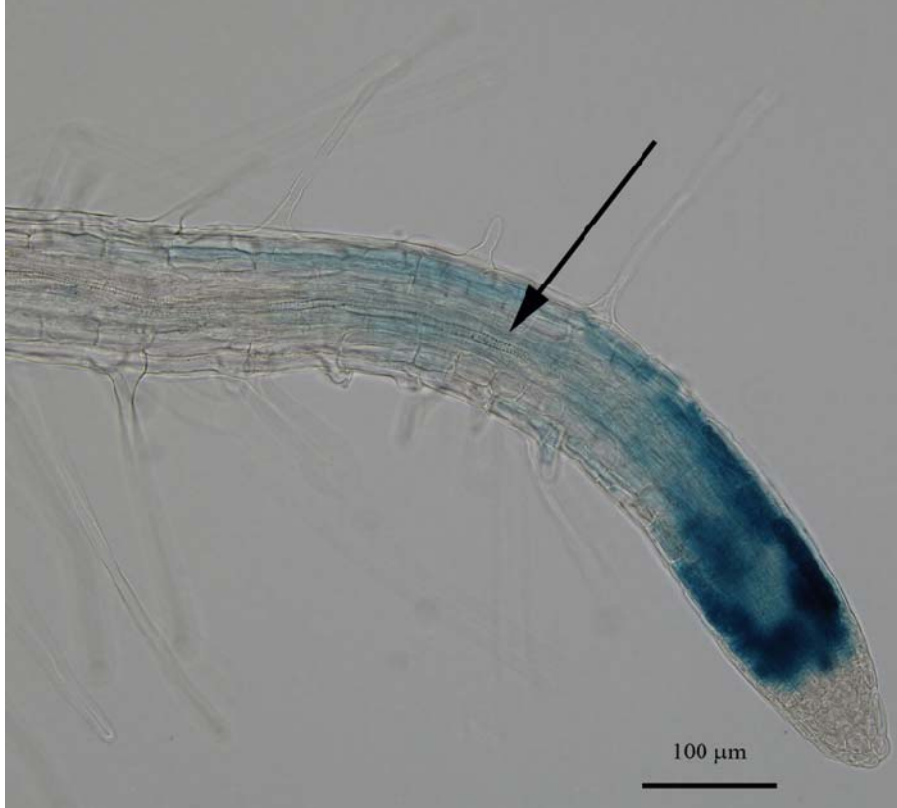


**Obr. č. 4.15:** Špičky kořenů rostlin *TTL4::uidA* - linie 43, pěstované v A - kontrolním mediu, B - mediu se sníženým obsahem fosforu, C - mediu se sníženým obsahem dusíku. Šipky označují pozici viditelných xylémových elementů.

4.15-B



4.15-C



## 4.6. Shrnutí výsledků

### Morfologické parametry kořenového systému rostlin v odpovědi na varianty výživy

- **Krátkodobý nedostatek živin** aplikovaný ve vodní kultuře mezi 14. až 19. dnem kultivace vyvolal změny v charakteru růstu kořenů.
  - V N-deficientním roztoku kořeny intenzivně rostly, v P-deficientních podmínkách došlo k postupnému zastavení růstu. Zastavení růstu bylo vyvoláno terminací aktivity apikálního meristému. Tato terminace již zůstala nevratná i po přenesení zpět do kontrolního media.
  - U rostlin krátkodobě trpících nedostatkem fosforu docházelo současně s terminací aktivity apikálního meristému k diferenciaci pletiv v těsné blízkosti za špičkou kořene. Na mikroskopické úrovni byla dobře patrná diferencovaná vodivá pletiva a kořenové vlásky v krátké vzdálenosti za špičkou. Také primordia postranních kořenů se nacházela blízko u sebe a ve velmi krátké vzdálenosti za špičkou mateřského kořene.
  - Změny v charakteru růstu kořenů se výrazněji projeví u menších rostlin (experiment VK2), u rostlin s celkově větší biomasou (experiment VK3) byl efekt méně výrazný. Větší biomasa zřejmě do jisté míry pufrovala krátkodobý nedostatek živin.
- **Dlouhodobý nedostatek živin** aplikovaný v agarové *in-vitro* kultuře po celou dobu kultivace vyvolal výrazné snížení rychlosti růstu N i P deficientních rostlin, nejkratší kořenový systém však byl zaznamenán v podmínkách nedostatku P. V obou deficientních variantách byla současně zaznamenána diferenciace pletiv v těsné blízkosti špičky kořene.
- Jednotlivé nezávisle transformované linie se lišily v celkové rychlosti růstu. Rostliny *TTL1::uidA* - linie 83 i 102 dosáhly vyšší rychlosti růstu nadzemní části i kořenového systému oproti ostatním liniím. Tento efekt je pravděpodobně způsoben rozdíly v kvalitě semen. Rostliny *TTL1::uidA* - linie 83 se také během experimentu projeví jako nejméně citlivé ke krátkodobému nedostatku živin (experiment VK3).

## Změny v aktivitě promotoru *TTL* genů v různých podmínkách výživy

### Obecná charakteristika lokalizace aktivity promotoru genů *TTL* rodiny

- Všechny sledované geny *TTL* jsou aktivní v kořenovém systému rostlin, liší se však jejich detailní lokalizace.
  - Promotor genů *TTL1* a je aktivní v primordiích postranních kořenů, ve středním válci hlavního kořene i kořenů postranních. U rostoucích kořenů je aktivita patrná také v oblasti apikálního meristému - v oblasti iniciál, protodermu a laterální kořenové čepičky.
  - Promotor genu *TTL3* je aktivní mimo střední válec kořene. Aktivita je patrná v primordiích a v celém objemu apikálního meristému u velmi mladých postranních kořenů krátce po vynoření. U starších postranních kořenů je aktivita lokalizována v apikální části kořene, především v laterální kořenové čepičce, a méně intenzivně také v povrchových strukturách (rhizodermis/primární kůra).
  - Aktivita promotoru genu *TTL4* vykazuje podobně jako *TTL1* lokalizaci v primordiích a ve středním válci kořene. Ve středním válci je však patrná pouze v postranních kořenech, především na jejich bázi, ve starších kořenech mizí. U některých postranních kořenů je aktivity přítomná také v oblasti kolumely, ne však v klidovém centru a proximální části meristému, v některých případech ji nalezneme v laterální kořenové čepičce.

### Změny aktivity promotoru po krátkodobém nedostatku živin

- Krátkodobý nedostatek živin vyvolal změny v intenzitě a lokalizaci aktivity promotorů, které korespondovaly s intenzitou růstu kořenového systému v daných podmínkách výživy. Změny byly zjišťovány pomocí analýzy obrazu naskenovaných kořenových systémů, kdy byla hodnocena plocha s přítomností modré barvy značící aktivitu enzymu  $\beta$ -glukuronidázy.
  - Nejvýraznější trend byl pozorován u promotoru genu *TTL4*. Procentuální zastoupení plochy kořenového systému s detekovatelnou aktivitou promotoru *TTL4* bylo vyšší u pomaleji rostoucích kořenových systémů. V P-deficientní variantě navíc vždy tyto plochy vykazovaly větší intenzitu aktivity (intenzivnější modré zabarvení). Tyto výsledky na mikroskopické úrovni



korespondovaly se zachováním aktivity promotoru ve špičkách delších PK (v oblasti apikálního meristému) u P-deficientních rostlin, která v aktivně rostoucích PK v ostatních variantách byla pozorována jen ojediněle.

- Změny v aktivitě promotoru genu *TTL3* nejsou jednoznačné, protože korelace mezi velikostí kořenového systému a procentuálním zastoupením oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou nevykazovala u experimentů VK2 a VK3 shodný trend. V obou kultivacích však plochy s detekovatelnou aktivitou promotoru vykazovaly výraznější intenzitu aktivity (intenzivnější modré zabarvení) v P-deficientní variantě podobně jako u promotoru genu *TTL4*.
- V případě promotoru genu *TTL1* byly rostliny kultivovány jen v experimentu VK3 a vykazovaly jen velmi slabou odezvu na varianty výživy

### **Změny aktivity promotoru po dlouhodobém nedostatku živin**

- V případě promotoru *TTL3* vykazovaly N-deficientní a kontrolní rostliny srovnatelné hodnoty procentuálního zastoupení oblastí s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořenového systému. Tyto hodnoty byly vyšší než u P-deficientních rostlin. P-deficientní rostliny nicméně vykazovaly vyšší intenzitu aktivity promotoru (intenzivnější modré zabarvení) v daných oblastech. Tento trend odpovídal výsledkům experimentu VK2.
- V případě promotoru *TTL4* se procentuální zastoupení oblastí s detekovatelnou GUS aktivitou z celkové plochy kořenového systému mezi variantami výživy nelišilo. P-deficientní rostliny nicméně podobně jako v případě *TTL3* vykazovaly vyšší intenzitu aktivity promotoru (intenzivnější modré zabarvení) v P-deficientní variantě. Na mikroskopické úrovni byla také patrná intenzivní aktivita promotoru v oblasti proximálního meristému u P i N deficientních rostlin. Rostliny v kontrolním mediu měly aktivitu promotoru v oblasti apikálního meristému slabší a homogenněji distribuovanou.

### **Shrnutí obecného trendu pro *TTL 1*, *TTL3* a *TTL4***

- Přestože ne vždy byly získány statisticky průkazné rozdíly mezi variantami kultivace, je patrné že se aktivita promotorů jednotlivých *TTL* genů mění v závislosti na podmínkách prostředí. Na základě získaných výsledků je pravděpodobné, že tyto změny korelují spíše s intenzitou růstu kořenového systému v daných podmínkách výživy než s reakcí na dostupnost dusíku nebo fosforu jako takovou.

## 5. Diskuze

Pomocí molekulární metody gene trap byl nalezen gen *TTL3*, jako možný kandidát hrající roli při vývoji postranních kořenů. Tuto roli naznačuje charakteristická lokalizace aktivity promotoru v kořenovém systému rostlin (Sefrnova, Y. 1 et al. 2011, Soukup, A. et al. 2012). V různých fázích vývoje postranních kořenů jsou aktivní i další dva členové genové rodiny *TTL* – *TTL1* a *TTL4* (Hilgert Delgado A. 2011, Sefrnova, Y. 1 et al. 2011, Soukup, A. et al. 2012). Funkce jednotlivých genů *TTL* zůstává nejasná, spekuluje se o funkci co-chaperonů s pravděpodobným zapojením v některé z regulačních drah účastnících se vývoje kořenového systému. Dokumentován byl však zatím pouze vztah k osmotickému stresu (Lakhssassi, N. et al. 2012, Rosado, A. et al. 2006), diferenciaci vodivých pletiv a auxinové či brassinosteroidové signalizaci (Ceserani, T. et al. 2009). Cílem diplomové práce bylo charakterizovat možné změny v aktivitě promotoru jednotlivých genů *TTL* v kořenovém systému rostlin při změně podmínek výživy, které indukují změny v růstu a morfologii kořenového systému ve smyslu rovnováhy mezi růstem a diferenciací. Tyto výsledky by mohly pomoci blíže specifikovat funkci genů *TTL* v procesu růstu kořenů.

### 5.1. Růst rostlin

Při experimentech byly využity transgenní rostliny připravené transkripční fúzí – nesoucí reportérový gen pro  $\beta$ -glukoronidázu spolu s promotorem daného genu *TTL*. Růst rostlin by po této modifikaci teoreticky neměl být ovlivněn, nicméně vliv začlenění konstruktů na okolní část genomu nelze při takové transformaci vyloučit. Proto byla provedena kultivace velkého souboru rostlin a v rámci této kultivace hodnocen celkový růst rostlin vždy u dvou nezávisle transformovaných linií se záměrem zachytit případné rozdíly.

Z vyhodnocení parametrů charakterizujících morfologii kořenového systému a růst nadzemní části (konkrétně plocha průmětu listových růžic) je patrné, že rostliny *TTL1::uidA* - linie 83 a 102 se od rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 a 32, *TTL4::uidA* - linie 40 a 43 liší. *TTL1::uidA* - linie 83 a 102 mají větší plochu nadzemní části ve srovnání se zbývajícím liniemi, bez ohledu na variantu výživy. Detailní morfologické parametry kořenového systému byly hodnoceny jen u tří vybraných linií, ale i zde jsou rozdíly v růstu jednotlivých linií patrné. Hodnoty celkové délky kořenového systému, délky a počtu PK rostlin *TTL1::uidA* - linie 83 jsou prokazatelně vyšší než u zbývajících dvou zkoumaných linií (linie *TTL3::uidA* - linie 30 a *TTL4::uidA* - linie 43). Linie *TTL1::uidA* - linie 83 se odlišuje i ve skutečnosti, že vykazuje jen minimální odezvu na odlišné varianty výživy. V rámci experimentu VK3 byla

provedena kultivace původního genotypu *Arabidopsis thaliana* Col 0 za stejných podmínek, za jakých byly kultivovány transgenní rostliny. Tato kultivace byla provedena kvůli porovnání růstu transformovaných linií od původního genotypu.

Na základě velikosti plochy listových růžic a délky kořenového systému se potvrdil výrazně intenzivnější růst u linií *TTL1::uidA* - linie 83 a 102, neboť tyto linie měly hodnoty zmíněných parametrů výrazně větší než rostliny divokého genotypu. Naopak rostliny *TTL3::uidA* - linie 30 a 32, *TTL4::uidA* – linie 43 a 40 se rychlostí růstu výrazně nelišily od rostlin divokého genotypu.

Variabilita a nestabilita exprese reportérového genu mezi liniemi transformovanými stejným konstruktem je častým jevem. Může být způsobena různými faktory, které mají vliv na intenzitu umlčování transgenu, např. počtem inzercí, přítomností různých regulačních elementů a pozičním efektem (De Bolle, M. F. C. et al. 2003, Gelvin, S. B. and Kim, S. I. 2007, Matzke, A. J. M. and Matzke, M. A. 1998, Schubert, D. et al. 2004). V některých případech byl kromě různé míry exprese reportérového genu pro  $\beta$ -glukuronidázu dokumentován i odlišný růst nezávisle transformovaných linií, např. u *Hevea brasiliensis*, kde však byly rostliny transformovány jinou metodou (Lardet, L. et al. 2011). Výše zmíněná variabilita mezi liniemi je navíc nahodilá a může proto obtížně vysvětlit odlišný růst obou nezávisle transformovaných linií *TTL1::uidA* (linie 83 a 102) oproti ostatním liniím. Nabízí se spíše vysvětlení systémové. Linie *TTL1::uidA* byly připraveny později než *TTL3::uidA* a *TTL4::uidA*, semena jsou tedy mladší a jejich kvalita může být lepší, což ovlivňuje rychlost růstu v experimentální kultuře. Větší biomasa zřejmě také způsobuje, že rostliny *TTL1::uidA* (linie 83 a 102) méně citlivě reagují na krátkodobé přenesení do podmínek deficeience.

## 5.2. Změny v morfologii kořenového systému

V rámci experimentů VK2 a VK3 (kultivace ve vodní kultuře) byly rostliny vystaveny krátkodobým změnám v dostupnosti dusíku a fosforu, aby bylo možné v krátkodobém horizontu sledovat možnou změnu v lokalizaci či intenzitě aktivity promotoru genů, třeba případnou výraznější aktivitu promotoru v souvislosti s nedostatkem některé z živin či závislost mezi aktivitou promotoru a délkou kořenového systému či rychlostí růstu. V kultuře *in-vitro* byl současně sledován dlouhodobý vliv stejných variant výživy. Takto byly experimenty provedeny proto, že použité varianty výživy by měly navodit výrazně kontrastní růstovou odpověď kořenového systému, jak vyplývá z doposud publikovaných výsledků.

Rostliny *Arabidopsis thaliana* trpící nedostatkem fosforu upřednostňují růst postranních kořenů oproti kořenu hlavnímu (Al-Ghazi, Y. et al. 2003). Prodlužování postranních kořenů

v daných podmínkách bylo pozorováno hned několikrát (např. (Al-Ghazi, Y. et al. 2003, Lopez-Bucio, J. et al. 2002, Williamson, L. C. et al. 2001)), ovšem zvýšený počet PK byl pozorován jen v některých případech (Lopez-Bucio, J. et al. 2002, Williamson, L. C. et al. 2001), Al-ghazi a kol. (2003) pozorovali naopak snížený výskyt PK při nízké dostupnosti fosforu. Možné vysvětlení rozdílných pozorování nabízí existence dvou fází reakce na nedostatečný přísun fosforu, kdy nejdříve dochází k prodlužování a zvýšené produkci postranních kořenů, ale po 11 dnech kultivace jsou růstové parametry negativně ovlivněny (Nacry, P. et al. 2005). Inhibice růstu hlavního kořene se dává do souvislosti s vymizením aktivity apikálního meristému, které může být za určitých okolností vratné (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005).

Naopak při nedostatku dusíku v prostředí rostliny stimulují růst kořenového systému na úkor nadzemní části (Ikram, Sobia et al. 2012) - dochází k prodlužování hlavního i postranních kořenů (Ruffel, S. et al. 2011). Zvýšená koncentrace nitrátu lokálně aplikovaná k rostlinám trpícím nedostatkem dusíku navíc způsobuje lokální prodlužování postranních kořenů (Zhang, H. M. et al. 1999) a za určitých podmínek zřejmě také zvýšení počtu PK (Linkohr, B. I. et al. 2002).

Většina publikovaných dat se nicméně týká rostlin rostoucích po celou dobu od vyklíčení v daných podmínkách výživy, navíc v podmínkách *in-vitro*. V první fázi hodnocení výsledků experimentů bylo proto analyzováno, zda je možno také u rostlin ve vodní kultuře po krátkodobém přenesení (na dobu 6 dní) do kultivačního roztoku se sníženým obsahem dusíku nebo fosforu zaznamenat obdobné změny v charakteru růstu kořenů. Tyto výsledky (kultivace VK2 a VK3) pak byly srovnávány s paralelně probíhající *in-vitro* kultivací (kultivace IV1) se stejnými variantami výživy aplikovanými od počátku kultivace. Kultivace rostlin již od vyklíčení v deficientních podmínkách ve vodní kultuře (kultivace VK1) se ukázala jako neproveditelná z důvodu vysoké úmrtnosti deficientních rostlin.

Data získaná z experimentů byla do jisté míry variabilní, přesto lze z naměřených hodnot na základě statisticky potvrzených rozdílů či viditelných trendů vyvodit některé závěry.

U rostlin *TTL3::uidA* - linie 30, byla ve VK2 pozorována průkazně větší celková délka kořenového systému rostlin kultivovaných závěrečných 6 dní kultivace (mezi 14. - 19. dnem kultivace) při nedostatku dusíku oproti rostlinám v kontrolním i P-deficientním roztoku. Při opakování experimentu na větším souboru rostlin (VK3) rostliny trpící nedostatkem dusíku tvořily mírně větší kořenový systém než rostliny kontrolní a P-deficientní, rozdíly mezi variantami však nebyly statisticky průkazné. Kořenový systém P-deficientních rostlin ve srovnání s rostlinami pěstovanými v mediu se sníženou koncentrací nitrátu byl také

větvenější, což dokládá větší počet kořenů. Statisticky průkazné výsledky však opět byly získány pouze u VK2 nikoli VK3. U P-deficientních rostlin zřejmě došlo k terminaci aktivity apikálního meristému, což by vysvětlovalo zastavení růstu hlavního kořene.

U rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 kultivovaných na agarových plotnách (IV1) byl pozorován největší, ale také největvenější kořenový systém, u rostlin kontrolních. Nejmenší kořenový systém vykazovaly P-deficientní rostliny, které měly i nejmenší počet postranních kořenů. Rostliny pěstované ve vodní kultuře a *in-vitro* byly přibližně stejně staré (vodní kultura – 19 denní rostliny, *in vitro* – 17 denní rostliny), proto lze rozdíly ve výsledcích charakterizujících morfologii kořenového systému přisoudit délce kultivace v podmínkách deficiencie dusíku a fosforu. Rostliny vystavené nedostatku dusíku krátkodobě mají ve srovnání s kontrolními rostlinami delší kořenový systém, rostliny dlouhodobě N-deficientní mají kořenový systém podobně velký jako rostliny P-deficientní a tedy menší oproti rostlinám kontrolním.

Růst rostlin linie *TTL4::uidA* - linie 43 vykazoval v jednotlivých experimentech podobné trendy jako u *TTL3::uidA* - linie 30. Ve VK2 vykazovaly rostliny *TTL4::uidA* - linie 43 s nižší dostupností dusíku během závěrečných šest dní kultivace (mezi 14.-19. dnem kultivace) průkazně delší kořenový systém oproti rostlinám v kontrolním nebo P-deficientním mediu, ve VK3 nebyly statisticky průkazné rozdíly nalezeny.

V případě kultivace IV1 byla celková délka kořenového systému P-deficientních rostlin srovnatelná s N-deficientními rostlinami a obě deficientní varianty měly výrazně kratší kořenový systém oproti kontrolním rostlinám.

Rostliny *TTL1::uidA* - linie 83 byly kultivovány pouze ve VK3. V rámci této kultivace nebyl prokázán signifikantní rozdíl v hodnocených parametrech v závislosti na variantě výživy. Z naměřených dat není patrný ani žádný výrazný trend. Pouze N-deficientní rostliny měly delší hlavní kořen a P-deficientní rostliny vykazovaly trend největšího počtu postranních kořenů z pěstovaných variant.

Všechny linie pěstované v rámci experimentu VK3 navíc vykazovaly nejmenší plochu nadzemní části při kultivaci v živném roztoku se sníženou koncentrací nitrátu. Ze získaných dat je patrné, že rostliny trpící krátkodobě nedostatkem dusíku upřednostňují růst kořenového systému nad růstem nadzemní části, v souladu s tím dochází k prodlužování hlavního i postranních kořenů.

Jak je patrné z výše uvedených údajů shrnujících experimenty provedené v rámci diplomové práce i údajů publikovaných v literatuře (Al-Ghazi, Y. et al. 2003, Lopez-Bucio, J. et al. 2002, Nacry, P. et al. 2005, Sanchez-Calderon, L. et al. 2005, Williamson, L. C. et al. 2001), uspořádání experimentu (kultivační podmínky, způsob navození deficiencie,...) může

do značné míry ovlivňovat morfologii kořenového systému. Proto nejsou překvapující rozdíly mezi výsledky z kultivací, kde byly sledovány krátkodobé změny v uspořádání kořenového systému (po krátkodobém přenesení do podmínek deficiencie ve vodní kultuře) a kultivací na agarových plotnách, kdy byly rostliny vystaveny nedostatku dusíku nebo fosforu dlouhodobě a to od počátku kultivace. Překvapivější je skutečnost, že se ne vždy podařilo najít stejné statisticky průkazné trendy v růstové odpovědi kořenového systému mezi VK2 a VK3. Ve VK3 byla zaznamenána obecně slabší odpověď rostlin na varianty výživy. To může souviset se skutečností, že se tyto kultivace mírně lišily některými kultivačními podmínkami (kultivační místnost, ozáření, objem kultivačních nádob), které zřejmě ovlivnily celkový růst. Rostliny ve VK3 dosáhly při stejném stáří 19 dnů výrazně větší celkové délky kořenového systému (bez ohledu na varianty výživy) oproti rostlinám ve VK2. Větší biomasa pak zřejmě zmírnila dopad nedostatku živin a statisticky průkazné rozdíly se v komplexnějším kořenovém systému nepodařilo zaznamenat. Rostliny se také mezi VK2 a VK3 lišily fyziologickým stářím, přestože byly kultivovány identický počet dní. Ve VK3 většina rostlin při odběru již přecházela do generativní fáze a tvořila poupata, ve VK2 nikoli. Výsledky experimentu VK3 navíc ukazují na určité problémy se standardizací podmínek ve vodní kultuře. Každá varianta živného roztoku byla v tomto experimentu zastoupena dvěma samostatnými nádobami. Přestože byly v každé nádobě nastoleny identické experimentální podmínky (stejná místnost a umístění v ní, osvětlení, nádoby, roztoky živného media, stejný objem roztoků i způsob provzdušnění), rostliny stejné linie ze dvou nádob totožné varianty vykazovaly mírně odlišné růstové parametry. V mnoha případech byl statistikou potvrzen vliv rozdílných nádob na hodnocený parametr, což patrně také vedlo k statisticky neprůkazným rozdílům mezi variantami výživy.

Na základě výsledků z provedených experimentů lze nicméně konstatovat, že různé varianty výživy ve většině případů navodily předpokládané rozdíly v rychlosti růstu kořenů. U rostlin *TTL3::uidA* - linie 30 pěstovaných ve vodní kultuře je patrný trend intenzivního růstu v substrátu se sníženým obsahem nitrátu. U rostlin *TTL4::uidA* - linie 43 pěstovaných za stejných podmínek je patrná snížená intenzita růstu v případě rostlin trpících nedostatkem fosforu. U rostlin této linie, pěstovaných v mediu se sníženým obsahem nitrátu není trend intenzivního růstu tak patrný jako u *TTL3::uidA* - linie 30, ve srovnání s rostlinami trpícími nedostatkem fosfátu však můžeme konstatovat, že k pozastavení růstu nedochází. U rostlin kultivovaných *in-vitro* je ve srovnání s rostlinami z vodních kultur největší rozdíl patrný u N-deficientních rostlin, které při dlouhodobém vystavení nedostatku živiny rostly velmi podobně jako rostliny trpící nedostatkem fosforu. Měly tedy menší kořenový systém než

rostliny kontrolní. P-deficientní rostliny dlouhodobě trpící nedostatkem fosforu (IV1) tvořily méně postranních kořenů ve srovnání s rostlinami kontrolními. Rostliny vystavené krátkodobě nedostatku fosforu (VK2 a VK3) měly oproti kontrolním rostlinám větší počet PK.

### **5.3. Změny v růstu kořenů na mikroskopické úrovni**

Sanchez-Calderon a kol. (2005) vysvětluje změny v morfologii kořenového systému P-deficientních rostlin terminací aktivity apikálního meristému, kterou dokládá předčasná diferenciací buněk, např. výskyt diferencovaného protoxylému a tvorba kořenových vlásků v oblasti kořene, kde dříve bývala elongační zóna (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005). Také vzdálenost mezi prvním postranním kořenem a špičkou hlavního kořene závisí na dostupnosti fosfátu, s její snižující se koncentrací se uvedená vzdálenost zkracuje, stejně jako samotná vzdálenost mezi jednotlivými PK (Williamson, L. C. et al. 2001).

Podobné změny byly zaznamenány i v kultivacích provedených v rámci diplomové práce. Na mikroskopické úrovni byl velmi dobře patrný rozdíl ve vzdálenosti mezi prvními viditelnými diferencovanými elementy xylému od špičky kořene mezi jednotlivými variantami výživy. U rostlin kultivovaných ve vodní kultuře docházelo k diferenciaci xylému nejbližší špičky kořene u P-deficientních rostlin, tedy mnohem blíže než u rostlin N-deficientních a ve většině případů i rostlin z kontrolní varianty. V kontrolní variantě byly známky terminace aktivity meristému pozorovány ve VK3, což zřejmě souviselo s celkovým fyziologickým stavem rostlin, které v době odběru již přecházely do generativní fáze a tvořily poupata. Růst kořenů již tedy zřejmě nebyl tak intenzivní, což se nejvýrazněji projevovalo u hlavního kořene a dlouhých postranních kořenů. U rostlin dlouhodobě vystavených nedostatku živin v *in vitro* kultuře (experiment IV1) byla diferenciací xylému velmi blízko kořenové špičky dobře patrná nejen u P-deficientních rostlin, ale také u rostlin trpících nedostatkem dusíku, tedy u obou deficientních variant. Tento trend byl nezávislý na konkrétní rostlinné linii.

U P-deficientních rostlin z vodní kultury byla také pozorována tvorba postranních kořenů v blízkosti špičky hlavního kořene. Tato vzdálenost mezi prvním postranním kořenem a špičkou hlavního kořene byla viditelně kratší než u rostlin N-deficientních, u kterých byla srovnatelná se vzdáleností u kontrolních rostlin. Postranní kořeny se u P-deficientních rostlin zakládaly velmi blízko sebe, u rostlin trpících nedostatkem dusíku byla vzdálenost mezi těmito orgány mnohem větší (nebylo kvantifikováno). U P-deficientních rostlin se také kořenové vlásky nacházely v těsné blízkosti za špičkou kořene.

Po přenesení rostlin po šesti dnech z variant se sníženou koncentrací fosforu zpět do kontrolního media nebylo pozorováno obnovení aktivity apikálního meristému. V oblasti za špičkou hlavního kořene bylo možné pozorovat rostoucí postranní kořeny, hlavní kořen tedy nepokračoval v růstu. Schopnost obnovit aktivitu apikálního meristému je však částečně vratná. Byla pozorována časová závislost mezi dobou působení nedostatku fosforu a schopností obnovit aktivitu apikálního meristému. U rostliny, které trpěly nedostatkem fosfátu maximálně sedm dní, byla po sedmi dnech kultivace v mediu bohatém na fosfor pozorována obnovená aktivita apikálního meristému v podobě prodlužování hlavního kořene. Rostliny trpící nedostatkem fosforu osm dní, již nebyly po přesunu schopné obnovit aktivitu apikálního meristému a bylo u nich pozorováno prodlužování PK v blízkosti špičky hlavního kořene, nikoliv však kořene hlavního (Sanchez-Calderon, L. et al. 2005). Drobný rozdíl mezi výsledky, které jsem pozorovala v rámci své diplomové práce a které pozoroval Sanchez-Calderon a kol. (2005) mohou být způsobeny odlišnými způsoby kultivace (vodní kultura versus agarové plotny) nebo odlišným fyziologickým stavem rostlin (rozdílné stáří v době přesunu), jenž mohl vést k rozdílnému stupni vyčerpání apikálního meristému.

Na základě těchto mikroskopických pozorování lze tedy shrnout, že apikální meristém hlavního kořene (a podobně také delších postranních kořenů) se u P-deficientních rostlin nacházel ve stádiu postupné terminace aktivity a spolu s tím docházelo k postupnému ukončení růstu hlavní osy kořene. Podobný stav byl zaznamenán také u rostlin trpících po celou dobu kultivace (17 dní) nedostatkem N (kultivace IV1). Variantami výživy se tedy podařilo navodit očekávané změny v charakteru růstu kořenového systému.

Vztah mezi růstem (aktivitou apikálního meristému) a diferenciací je v kořeni řízen komplexní sítí regulačních drah, v nichž je zapojena řada rostlinných hormonů. Na udržení této rovnováhy mezi buněčnou proliferací a diferenciací mají mimo jiné výrazný vliv dvě skupiny fytohormonů: auxiny a cytokininy, zapojeny jsou však i další, např. gibereliny, brasinosteroidy nebo etylén. Cytokininy podporují diferenciaci buněk, auxin naopak buněčné dělení (Blilou, Ikram et al. 2005, Dello Ioio, R. et al. 2007, Dello Ioio, R. et al. 2008, Moubayidin, L. et al. 2009, Perilli, Serena et al. 2010). Jedním ze styčných míst auxinové a cytokininové signalizace v kořeni je aktivita genu *SHY2*. Cytokininy aktivují transkripci genu *SHY2*, jenž negativně ovlivňuje expresi *PIN* proteinů, které slouží jako přenašeče auxinu. Dojde tak k redistribuci auxinu, poklesu syntézy giberelinů a následně k diferenciaci buněk a zmenšení kořenového meristému. Naopak auxin způsobuje degradaci proteinu *SHY2*, což vede k udržení aktivity genů *PIN* a buněčné proliferace (Blilou, Ikram et al. 2005, Dello Ioio, R. et al. 2008). Gen *SHY2* je aktivován pomocí cytokinin-responsivního transkripčního



faktoru ARR1, jehož exprese je v raných fázích vývoje meristému potlačena působením giberelinů (Moubayidin, L. et al. 2010, Taniguchi, M. et al. 2007).

Změny v lokalizaci či aktivitě zmíněných hormonů, majících vliv na udržení rovnováhy mezi buněčnou proliferací a diferenciací, se mění v podmínkách deficiencie klíčových živin, tedy v situaci, které byly vystaveny transgenní rostliny kultivované v rámci této diplomové práce.

V případě cytokininů byl zaznamenán jejich pokles v listech u *Betula pendula* při nedostatku dusíku i nedostatku fosforu (Horgan, J. M. and Wareing, P. F. 1980). Stejný efekt byl pozorován i u *Helianthus-Annuus* (Salama, A. M. S. E. and Wareing, P. F. 1979). U *Arabidopsis thaliana* vedla aplikace cytokininů k redukci exprese několika genů responsivních při nedostatku fosforu (Martin, A. C. et al. 2000). Bohužel data, která by sledovala změny v expresi genů *TTL* při aplikaci cytokininů, nejsou k dispozici.

Na základě několika doposud publikovaných experimentů se zdá, že dostupnost fosforu ovlivňuje také pohyb auxinu v kořeni. Vzhledem k odlišným výsledkům publikovaných prací, však není zcela jasné jakým způsobem. U rostlin, které netrpí nedostatkem některé z živin, je v rostoucích kořenech auxinové maximum lokalizováno v distální oblasti kořenové špičky (Sabatini, S. et al. 1999). Sanchez-Calderon a kol. (2005) u rostlin kultivovaných při vysoké koncentraci P (1 mM) pozorovali expresi markeru auxinu *DR5:GUS* v oblasti klidového centra, iniciálách kolumely a kolumele. U rostlin trpících nedostatkem fosforu, se lokalizace auxinového maxima shodovalo s rostlinami kultivovanými při vysoké koncentraci fosforu jen první tři dny kultivace, v následujících dnech došlo k jeho postupnému vymizení. Nacry a kol. (2005) pozorovali opačný trend. U rostlin trpících nedostatkem fosforu byla detekována zvýšená akumulace auxinu ve špičce hlavního kořene a v mladých postranních kořenech. Tyto výsledky potvrdila analýza aktivity auxin responsivního markeru. Oba experimenty se sice lišily v hodnotě nízké koncentrace fosfátu (Nacry a kol. (2005) - 3μM, Sanchez-Calderon a kol. (2005) - 1μM), ale analyzované rostliny byly přibližně stejně staré. V publikovaných mikroskopických fotografiích kořenů jsou však patrné rozdíly. Fotky z experimentu, který provedl Nacry a kol. (2005), nesvědčí o výrazné diferenciaci kořenů, v blízkosti špičky kořene nejsou patrné kořenové vlásky, které však můžeme pozorovat u srovnatelně starých rostlin z experimentu Sanchez-Calderon a kol. (2005). Nemuselo tak dojít ani k výrazné ztrátě aktivity apikálního meristému kořene, což by mohlo vysvětlit rozdíly v distribuci a akumulaci auxinu v apexu kořene.

Role auxinu ve stimulaci tvorby postranních kořenů u P-deficientních rostlin se zdá být jasnější a zcela nezávislá na aktivitě apikálního meristému. Buňky pericyklu, jenž dávají

vzniknout postranním kořenům, jsou u P-deficientních rostlin citlivější vůči auxinu než rostliny mající dostatečný příjem fosforu, což způsobuje zvýšení tvorby primordií postranních kořenů a jejich vynoření. Změny v citlivosti buněk vůči auxinu jsou způsobeny změnami v expresi receptoru auxinu TIR1. Exprese *TIR1* se u rostlin trpících nedostatkem fosforu zvyšuje a navozuje již zmíněné změny ve vnímání auxinu. Ke zvýšení exprese *TIR1* nicméně dochází především v oblasti pericyklu, ne v meristému hlavního nebo postranních kořenů. Proto změna v citlivosti buněk vůči auxinu vlivem zvýšené exprese genu *TIR1* při nedostatku fosforu má zřejmě dopad pouze na větvení kořenů, nikoliv na aktivitu apikálního meristému (Perez-Torres, C. A. et al. 2008).

Expresní data z genových čipů (microarray) zveřejněná v databázi NCBI GEO (Edgar R, Domrachev M Lash AE. 2002)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) naznačují, že po aplikaci inhibitoru giberelinů (uniconazole) dochází ke snížení aktivity genu *TTL3* i *TTL4*. V případě genu *TTL1* nejsou data zcela jednoznačná (Rider, S. D. et al. 2003, Zhang, H. et al. 2008) (NCBI GEO databáze). Role giberelinů při snížené dostupnosti fosforu byla prokázána při vývoji kořenových vlásků. V P-deficientních rostlinách dochází k potlačení aktivity genů aktivujících gibereliny a naopak jsou aktivovány geny potlačující aktivitu giberelinů. Snížená hladina bioaktivních giberelinů následně vede k prodlužování kořenových vlásků (Jiang, C. F. et al. 2007). Gibereliny jsou zřejmě zapojeny v odpovědi rostlina na stres vyvolaný nedostatkem fosforu. Rostliny mající zvýšenou expresi genu *MYB62*, jenž se exprimuje specificky v listech P-deficientních rostlin, mají fenotyp shodující se s giberelin-deficientními rostlinami. Předpokládá se, že *MYB62* funguje jako transkripční represor genů biosyntetizujících gibereliny (Devaiah, B. N. et al. 2009).

V regulaci odpovědi rostlin v podobě změn v morfologii kořenového systému na různé varianty výživy se podílí další fytohormony. Kromě již zmíněných (auxin, cytokinin, gibereliny), mohou být do signálních drah zapojeny i brassinosteroidy, u nichž je znám jejich vliv na růst kořenů.

Brassinosteroidy se společně s auxinem podílí na mnoha fyziologických procesech, jako je diferenciací cév, prodlužování a dělení buněk, stimulace biosyntézy etylénu (Clouse, S. D. and Sasse, J. M. 1998, Ibanes, M. et al. 2009, Woodward, A. W. and Bartel, B. 2005). U *Arabidopsis thaliana* se auxin a brassinosteroidy spolupodílí na vývoji postranních kořenů (Bao, Fang et al. 2004). Brassinosteroidy navíc ovlivňují distribuci auxinů v rostlině. Konkrétně stimulují transport auxinu mezi hypokotylem a kořenem směrem ke kořenové špičce (Bao, Fang et al. 2004) a ovlivňují akumulaci auxinu skrze regulaci exprese genů *PIN*, které představují přenašeče auxinu (Li, L. et al. 2005).

Vliv brassinosteroidů na růst kořenů je závislý na koncentraci tohoto fytohormonu. Velmi nízká koncentrace brassinolidů ve spojení s auxinem podporuje prodlužování hlavního kořene, ovšem vysoká koncentrace způsobuje inhibici růstu ( $> 0,04$  nM) (Mussig, C. et al. 2003). Zkrácení růstu kořenů pod vlivem brassinosteroidů je způsobeno hlavně zmenšením velikosti kořenového meristému. Aplikace inhibiční koncentrace brassinosteroidů vede totiž ke snížení počtu buněk tvořících meristém. Zkrácení kořenů pod vlivem změn v signálních drahách brassinosteroidů je způsobeno hlavně chybami při proliferaci a diferenciaci buněk meristému (Gonzalez-Garcia, M. P. et al. 2011). Vliv brassinosteroidů na meristém kořenů není doprovázen změnami v expresi genů *PIN1*, *PIN3* a *PIN7*, které zprostředkovávají rovnováhu mezi proliferací a diferenciací buněk meristému (Hacham, Yael et al. 2011). Vztah genů *TTL* k auxinové a brassinosteroidové signalizaci je popsán detailněji v následující kapitole.

Udržení rovnováhy mezi růstem a diferenciací je zřejmě ovlivňováno i jinými signálními mechanismy, v nichž nehrají přímou roli fytohormony. Tsukagoshi a kol. (2007) navrhli model, v němž hraje roli redoxní potenciál a aktivita peroxidáz. Udržení buněčné proliferace je v něm závislé na koncentraci reaktivních forem kyslíku, zatím co buněčná diferenciace vyžaduje zvýšenou koncentraci peroxidu vodíku. Důležitou roli hraje gen *UPB1*, který reguluje expresi genů pro peroxidázy. Peroxidázy následně regulují rovnováhu mezi reaktivními kyslíkovými formami. Tento model je nezávislý jak na auxinu, tak na cytokininech.

*TTL* obsahují ve své struktuře tzv. thioredoxin-like motiv (Rosado, A. et al. 2006). Tato sekvence postrádá jeden ze dvou cysteinových zbytků, jenž se nacházejí v thioredoxinech a jsou zodpovědné za jejich redukční charakter (Ceserani, T. et al. 2009). Geny *TTL* tak zřejmě postrádají redukční schopnosti. Látka dithiothreitol (DTT) představuje substrát pro thioredoxiny a oxidační zdroj (Buchanan, B. B. et al. 1979). V případě genů *TTL3* a *TTL4* došlo po aplikaci DTT ke snížení aktivity po ošetření rostliny uvedenou látkou. Reakce genu *TTL1* na ošetření je nejednoznačná (Kolbe, A. et al. 2006) (NCBI GEO databáze). Zapojení genů do ovlivnění rovnováhy mezi buněčnou proliferací a diferenciací na základě ovlivnění redoxního potenciálu se tedy nezdá pravděpodobná.

## **5.4. Změny aktivity promotoru *TTL* genů v odpovědi na varianty výživy**

Jak již bylo výše uvedeno, geny rodiny *TTL* mohou být zapojeny v regulaci růstu a vývoje postranních kořenů (Hilgert Delgado A. 2011, Sefrnova , Y. 1 et al. 2011, Soukup, A. et al. 2012), či procesů, které s růstem a diferenciací souvisí, např. diferenciace vodivých pletiv, či auxinová nebo brassinosteroidová signalizace (Ceserani, T. et al. 2009). V rámci mé diplomové práce jsem se proto zaměřila na konkrétnější popis lokalizace a intenzity aktivity genů *TTL1*, *TTL3* a *TTL4*. Aktivita promotorů těchto genů byla sledována v různých podmínkách výživy, které v kořenovém systému navodily změny v rovnováze mezi růstem a diferenciací. Ve směsném vzorku celého kořenového systému by se však ztratila informace o možných změnách v lokalizaci aktivity. Bylo proto přistoupeno k hodnocení pomocí obrazové analýzy, která umožnila kvantifikovat plochu s detekovatelnou aktivitou GUS a vyjádřit její podíl na celkové ploše kořenového systému. Zároveň byla pro celou oblast s detekovanou aktivitou hodnocena průměrná intenzita modré barvy, která je orientačním ukazatelem míry aktivity v dané oblasti. Tyto výsledky pak byly doplněny podrobným pozorováním na mikroskopické úrovni, které umožňuje postihnout možné detailní změny v lokalizaci aktivity promotorů.

Vzhledem k faktu, že použité transgenní linie nebyly homozygotní, vykazovaly nezanedbatelnou míru variability exprese reportérového genu. Pro zpracování potřebných parametrů hodnotících aktivitu promotoru byly proto vždy vybírány pouze rostliny, které vykazovaly viditelnou přítomnost modré barvy indikující aktivitu GUS. Tím ovšem došlo ke snížení počtu opakování. Z důvodu většího počtu opakování je proto kladen větší důraz na výsledky z kultivací VK3 a IV1.

### **5.4.1. Aktivita promotoru *TTL4***

Promotor genu *TTL4* je v kořenovém systému *Arabidospis thaliana* aktivní v primordiích postranních kořenů, ve středním válci PK (především v jejich bazálních částech) a po určitou dobu vývoje také v apikálním meristému hlavního i postranních kořenů (Hilgert Delgado A. 2011, Sefrnova , Y. et al. 2011, Soukup, A. et al. 2012). Promotor je nicméně aktivní i mimo kořenový systém, např. v hydatodách a mezofylu listů (Hilgert Delgado A. 2011).

Experimenty provedené v rámci této diplomové práce naznačují, že intenzita aktivity a její detailní lokalizace v kořenovém systému se mění v závislosti na rychlosti růstu kořenů a aktivitě apikálního meristému.

Promotor genu *TTL4* byl aktivní hlavně v oblasti středního válce postranních kořenů, dále v primordiích postranních kořenů a slabě také v apikálním meristému kořene. U kontrolních rostlin je aktivita promotoru v hlavním kořeni velmi slabá, často není patrná vůbec. U postranních kořenů dochází s jejich prodlužováním k ustupování aktivity promotoru. N-deficientní rostliny se shodovaly s lokalizací aktivity promotoru s rostlinami kontrolními. Odlišnost v lokalizaci exprese promotoru můžeme pozorovat u P-deficientních rostlin, kde dochází k expresi promotoru i v hlavním kořeni, v laterální kořenové čepičce. Stejnou lokalizaci pak vykazují i špičky dlouhých postranních kořenů.

V případě experimentu VK2 mají rostliny *TTL4::uidA* - linie 43 trpící nedostatkem dusíku výrazně delší kořenový systém a nižší hodnotu procentuálního zastoupení oblastí kořene s aktivitou GUS oproti zbývajícím variantám. Kontrolní rostliny a rostliny trpící nedostatkem fosforu měly hodnoty charakterizující délku kořenového systému i procentuální zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou srovnatelné. Přibližně stejné hodnoty těchto dvou parametrů vykazují v experimentu VK3 rostliny kontrolní a trpící nedostatkem dusíku. Naopak rostliny pěstované při snížené koncentraci fosfátu měly nejmenší kořenový systém, ale nejvyšší hodnotu procentuálního zastoupení oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou oproti zbývajícím variantám. Z uvedených dat vyplývá, že aktivita promotoru genu *TTL4* není primárně svázána s přímou reakcí na dostupnost dané živiny, ale spíše s rychlostí růstu kořenů a postupem diferenciací.

Z výsledků obou kultivací (VK2 a VK3) je také patrný trend, kdy rostliny trpící nedostatkem fosforu mají nejnižší hodnotu průměrné intenzity modré barvy ze všech variant. Plocha s detekovanou GUS aktivitou je tedy tmavší než u ostatních variant, což naznačuje vyšší aktivitu promotoru *TTL4*. Tento trend platí i v případě kultivace IV1, kdy rostliny trpící nedostatkem fosforu mají nižší plochu (objem) pozitivních pletiv oproti rostlinám trpícím nedostatkem dusíku, přestože velikost jejich kořenového systému je srovnatelná (grafy č. 4.12 a 4.13). Tento výsledek naznačuje, že kromě obecnějšího vztahu mezi rychlostí růstu a aktivitou promotoru bude existovat rozdíl mezi P-deficientní a N-deficientní variantou, i když délka kořenového systému se lišit nemusí. Tímto rozdílem může být např. rozdíl mezi pokročilostí terminace aktivity apikálního meristému a s tím souvisejícím stupněm diferenciací pletiv v těsné blízkosti za špičkou kořene.

Pozorované rozdíly v intenzitě modré barvy na mikroskopické úrovni korespondují se zachováním aktivity promotoru ve špičkách dlouhých postranních kořenů i kořene hlavního u P-deficientních rostlin. Podobná lokalizace aktivity není v těchto fázích vývoje kořene již většinou patrná u rostlin z kontrolní a N-deficientní varianty, které rostou rychleji.

Na základě hodnocení rostlin *TTL4::uidA* - linie 43 lze shrnout, že čím menší kořenový systém, tím vyšší podíl ploch s aktivitou promotoru. Rostliny trpící nedostatkem fosforu mají navíc vždy nejnižší hodnotu průměrné intenzity modré barvy (tmavší modrá barva) ze všech variant. Z čehož lze usuzovat, že promotor genu *TTL4* je aktivnější v kořenech pomaleji rostoucích, kde dochází k diferenciaci pletiv blíže ke špičce kořene, což je ve zvýšené míře patrné u P-deficientních rostlin. Závislost na celkové délce je tedy zřejmě slabší než závislost na aktuální rychlosti/intenzitě růstu kořene, neboť u P-deficientních rostlin je hodnota průměrné intenzity modré barvy nižší oproti rostlinám trpícím nedostatkem nitrátu, které však měly srovnatelně velký kořenový systém.

Jak již bylo výše uvedeno, kořeny při přechodu k terminaci aktivity apikálního meristému při nedostatku fosforu prodělávají řadu změn v distribuci fytohormonů i citlivosti k nim. Je proto možné, že pozorované změny v intenzitě a lokalizaci aktivity promotoru *TTL4* u P-deficientních rostlin souvisí např. se změnami v distribuci auxinu či dalších fytohormonů v kořeni. Tuto skutečnost mohou pomoci dokumentovat případné změny v expresním profilu *TTL4* v odpovědi na ošetření auxinem. Expresních data z genových čipů (microarray) zveřejněná v databázi NCBI GEO (Edgar R, Domrachev M Lash AE. 2002) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ukazují, že po aplikaci auxinu byla ve většině případů pozorována mírně snížená exprese genu *TTL4* (Armstrong, J. I. et al. 2004, Nemhauser, J. L. et al. 2004, Stepanova, A. N. et al. 2007) (NCBI GEO databáze). Byly pozorovány i časové změny v expresi genu *TTL4* v závislosti na ošetření auxinem. Po dvou hodinách působení zmíněného fytohormonu došlo k poklesu aktivity uvedeného genu. Po šesti hodinách došlo ke zvýšení exprese, ta ale byla ve srovnání s neošetřenými rostlinami stále nízká (Vanneste, Steffen et al. 2005) (NCBI GEO databáze). V závislosti na aplikaci auxinu byla pozorována i zvýšená exprese genu *TTL4* (Nagpal, Punita et al. 2005) (NCBI GEO databáze). Rozdíly mezi experimenty mohou vyplývat z rozdílného stáří rostlin, části rostliny, z které byla RNA izolována a délce ošetření rostliny auxinem. Zvýšená exprese genu *TTL4* byla pozorována u vzorku pocházejícího z květů (Nagpal, Punita et al. 2005) (NCBI GEO databáze), časový průběh změn exprese byl pozorován u vzorků z kořene (Vanneste, Steffen et al. 2005) (NCBI GEO databáze), z těchto dat ale vyplývá, že dochází ke snížení exprese genu *TTL4* po ošetření auxinu vůči neošetřeným rostlinám. Ostatní vzorky, jež také prokázaly sníženou exprese, pocházely z celých rostlin (Armstrong, J. I. et al. 2004, Chung, Yuhee et al. 2011) (NCBI GEO databáze).

Expresa genu *TTL4* může být ovlivněna i dalšími faktory, které se podílejí na regulaci růstu a diferenciaci kořene – cytokininy, gibereliny, brassinosteroidy či změnami v redoxním

stavu pletiva. Souvislost mezi genem *TTL4* a brassinosteroidy zatím nebyla blíže prozkoumána, na rozdíl od genu *TTL3* (viz níže). Jsou známa pouze data získaná s pomocí genových čipů, která ukazují zvýšení exprese genu *TTL4* po aplikaci brassinosteroidů (Nemhauser, J. L. et al. 2004, Vert, G. et al. 2008) (NCBI GEO databáze).

Rostliny vystavené vnější aplikaci etylénu vykazovaly nižší úroveň exprese genu *TTL4* než rostliny, které nebyly vystaveny působení fytohormonu (Stepanova, A. N. et al. 2007) (NCBI GEO databáze).

#### **5.4.2. Aktivita promotoru *TTL3***

Lokalizace aktivity promotoru *TTL3* již byla v několika případech zkoumána. Bylo tak zjištěno, že je tento promotor aktivní kromě kořenového systému ještě v listové žilnatině, vodivých pletivech a hypokotylu (Hilgert Delgado A. 2011), svěracích buňkách a hydatodách (Ceserani, T. et al. 2009). V kořenovém systému byla konkrétně aktivita genu *TTL3* pozorována v oblasti apikálního meristému hlavního kořene (především laterální kořenové čepičce), v primordiích postranních kořenů a samotných postranních kořenech, konkrétně v apikálním meristému a epidermis/primární kůře. Lokalizace ve středním válci chybí, což *TTL3* odlišuje od *TTL4* i *TTL1* (Hilgert Delgado A. 2011, Sefrnova, Y. et al. 2011, Soukup, A. et al. 2012). Doposud však nebyla sledována změna aktivity promotoru v návaznosti na změny složení živného media.

V případě promotoru *TTL3* korelace mezi velikostí kořenového systému a procentuálním zastoupením oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou nevykazovala ve všech experimentech shodný trend. Odpověď na varianty výživy je podobná u experimentů VK2 a IV1 – nejmenší hodnotu procentuálního zastoupení ploch s GUS aktivitou mají rostliny trpící nedostatkem fosforu. V případě kultivace VK3 to jsou rostliny trpící nedostatkem dusíku, což na mikroskopické úrovni korespondovalo a např. s nižší aktivitou v povrchových strukturách (rhizodermis/pokožka) v bazálních částech středně dlouhých postranních kořenů.

Rozdíly mezi kultivacemi mohou souviset s rozdílným fyziologickým stavem rostlin v jednotlivých experimentech. Přestože stáří rostlin bylo velmi podobné (17-19 dní) a byly odebírány ve stejnou denní dobu, rostliny získané z kultivace VK2 i IV1 nekvetly a byly menší než rostliny z experimentu VK3, které skoro všechny v době odběru začínaly tvořit poupata. Ve všech případech (VK2, VK3 i IV1) nicméně plochy s detekovatelnou GUS aktivitou vykazovaly nižší hodnoty průměrné intenzity modré barvy (byly tmavší) u P-deficientních rostlin. Aktivita promotoru *TTL3* byla tedy v těchto oblastech vyšší.

Podobně jako v případě *TTL4* je způsob zapojení genu *TTL3* do regulace vývoje kořenového systému nejasný, přestože vykazuje charakteristickou lokalizaci aktivity promotoru v jeho jednotlivých částech. Výsledky získané během experimentů ukazují, že distribuce aktivity promotoru *TTL3* se může měnit v různých podmínkách prostředí. Negativní korelaci mezi procentuálním zastoupením ploch s detekovatelnou aktivitou a rychlostí růstu se nicméně podařilo prokázat jen v jednom ze tří provedených experimentů. Zapojení genu *TTL3* v regulaci růstu a diferenciaci kořenového systému přesto naznačuje jeho vztah k některým fytohormonům, které se těchto procesů účastní.

Rostliny mutantní v genu *TTL3* (*vit* mutanti, SALK\_029904) byly citlivější vůči auxinu a brassinosteroidům. Při vnější aplikaci těchto dvou fytohormonů měly mutantní rostliny kratší kořenový systém než rostliny s původním genotypem. Na ošetření gibereliny a kyselinou abscisovou mutant nereagoval (Ceserani, T. et al. 2009). Ceserani a kol. (2009) pozorovali také potlačení transkripce genu *TTL3* při ošetření rostlin auxinem. Na základě dat získaných s pomocí genových čipů (microarray) zveřejněných v databázi NCBI GEO (Edgar R, Domrachev M Lash AE. 2002) nelze označit změny exprese genu *TTL3* v reakci na působení auxinu za jednoznačné. Bylo pozorováno jak snížení exprese po 4 hodinách působení fytohormonu (Stepanova, A. N. et al. 2007) (NCBI GEO databáze). Nemhauser a kol. (2005) pozorovali po dvou hodinovém ošetření auxinem v jednom z odebraných vzorků snížení exprese, v druhém vzorku naopak zvýšení (NCBI GEO databáze). Zvýšení exprese genu *TTL3* bylo zaznamenáno u rostlin vystavených působení daného hormonu po dobu jedné hodiny (Armstrong, J. I. et al. 2004) (NCBI GEO databáze). Exprese genu *TTL3* v kořenech rostliny byla po šesti hodinách působení auxinu nižší než u rostlin, které nebyly vystaveny působení auxinu (Vanneste, Steffen et al. 2005) (NCBI GEO databáze). Vanneste a kol. (2005) sledovali časový průběh exprese genu v závislosti na ošetření auxinu, avšak výsledky nevykazovaly jednoznačný trend (NCBI GEO databáze). U vzorku pocházejícího z květů *Arabidopsis thaliana* byla stejně jako u genu *TTL4* pozorována zvýšená exprese (Nagpal, Punita et al. 2005) (NCBI GEO databáze). Exprese genu *TTL3* tak zřejmě závisí na konkrétním rostlinném orgánu a také na délce působení auxinu – je zde trend naznačující, že s rostoucí dobou působení dochází k poklesu exprese.

Bylo prokázáno, že samotný gen *TTL3* ovlivňuje odpověď některých auxin responsivních genů v reakci na přídavek auxinu v substrátu. Konkrétně se jedná o geny *ARF19*, *SAUR46*, *GH3-1*, jejichž exprese je u mutanta s nefunkčním genem *TTL3* při ošetření auxinem více stimulována, zatímco exprese genu *IAA18* je méně potlačena oproti rostlinám s původním genotypem (Ceserani, T. et al. 2009).



Gen *TTL3* je zřejmě zapojen i do signálních drah, kde hrají roli brassinosteroidy. U mutantu *vit*, s nefunkčním genem *TTL3* (SALK\_029904), bylo pozorováno zvýšení exprese některých brassinosteroid-responsivních genů: *BZR1*, *BR11* a *CPD* (Ceserani, T. et al. 2009). Navíc Ceserani a kol. (2009) pozorovali zvýšení transkripce tohoto genu po ošetření brassinosteroidy, což potvrdila i data získaná s pomocí genových čipů (microarray) (Nemhauser, J. L. et al. 2004, Vert, G. et al. 2008) (NCBI GEO databáze). Na aplikaci brassinozolu společně s auxinem reaguje gen *TTL3*, ve srovnání s rostlinami, na něž působí pouze auxin, snížením exprese. Stejně reagoval i gen *TTL4* (Chung, Yuhee et al. 2011) (NCBI GEO databáze). Gen *TTL3* je zřejmě také zapojen do regulace diferenciací vodivých pletiv. U *vit* mutantu s nefunkčním genem *TTL3* (SALK\_029904) byly zaznamenány defekty v uspořádání listové žilnatiny, v kořenech však tento aspekt analyzován nebyl (Ceserani, T. et al. 2009).

#### 5.4.3. Aktivita promotoru *TTL1*

Lokalizace aktivity promotoru *TTL1* byla již dříve pozorována v úžlabních pupenech, svěracích buňkách a žilnatině embrya. V kořenovém systému byla pozorována v kořenové čepičce a cévních svazcích kořene (Lakhsassi, N. et al. 2012, Rosado, A. et al. 2006).

V experimentech provedených v rámci diplomové práce byly rostliny *TTL1::uidA* pěstovány pouze ve VK3 a vykazaly jen minimální citlivost ke krátkodobě změně dostupnosti živin. Růst kořenů a podobně také velikost plochy s detekovatelnou aktivitou GUS se nelišily v závislosti na variantě výživy, přestože u P-deficientních rostlin bylo možné sledovat slabý trend menší plochy s detekovatelnou GUS aktivitou, rozdíl oproti ostatním variantám však nebyl statisticky průkazný. Lišila se pouze intenzita modré barvy, která vykazovala nižší hodnotu (tmavší modrou barvu) u P-deficientních rostlin.

Detailní lokalizace aktivity promotoru *TTL1* v kořenovém systému je částečně podobná *TTL4*. U kontrolních rostlin *TTL1::uidA* - linie 83 byla zaznamenána ve středním válci hlavního i postranních kořenů, a to v celé délce od elongační zóny až po bázi, bez ohledu na stáří postranních kořenů. Exprese promotoru pak byla patrná v povrchové oblasti špičky (laterální kořenové čepičce) hlavního i postranních kořenů a v primordiích postranních kořenů.

N-deficientní rostliny se od kontrolních a P-deficientních rostlin lišily v lokalizaci aktivity promotoru v oblasti apexu hlavního kořene a dlouhých postranních kořenů, byla u nich pozorována především výraznější aktivita v oblasti elongační zóny. Tyto rozdíly zřejmě

korespondují s intenzivnějším růstem N-deficientních rostlin. Zatímco u P-deficientních rostlin, a částečně i rostlin kontrolních, došlo k terminaci aktivity apikálního meristému.

Gen *TTL1* reaguje na působení auxinů zvýšenou expresí jen v případě hodinového působení fytohormonu (Armstrong, J. I. et al. 2004) (NCBI GEO databáze). Při delším působení auxinu je exprese buď srovnatelná s neošetřenými rostlinami (Stepanova, A. N. et al. 2007) (NCBI GEO databáze), nebo nižší (Nemhauser, J. L. et al. 2004, Vanneste, Steffen et al. 2005) (NCBI GEO databáze). Oproti genům *TTL3* a *TTL4* byla v květech po ošetření auxinem zaznamenána nižší exprese (Nagpal, Punita et al. 2005) (NCBI GEO databáze).

Výrazná změna v míře exprese genu *TTL1* nebyla pozorována při aplikaci etylénu (Stepanova, A. N. et al. 2007) (NCBI GEO databáze), v případě brassinosteroidů existují data ukazující na zvýšení exprese (Vert, G. et al. 2008) (NCBI GEO databáze), ale také skoro žádnou její změnu (Nemhauser, J. L. et al. 2004) (NCBI GEO databáze). Každopádně spolupůsobení auxinu a brassinozolu vyvolalo ve srovnání s ošetřením auxinem sníženou expresi genu (Chung, Yuhee et al. 2011) (NCBI GEO databáze).

## 6. Závěr

Na základě aktivity promotoru v postranních kořenech byly geny *TTL1*, *TTL3* a *TTL4* vytipovány jako kandidáti hrající roli při vývoji postranních kořenů. Ve snaze blíže specifikovat funkci těchto genů v procesu růstu kořenů, byly transgenní rostliny nesoucí promotorovou fúzi s reportérovým genem pro  $\beta$ -glukuronidázu pěstovány v různých variantách výživy s cílem ovlivnit růst kořenového systému a sledovat změny v aktivitě jednotlivých promotorů.

Rozdílná dostupnost klíčových makroprvků, dusíku a fosforu, podle očekávání navodila změny v růstu a morfologii kořenového systému, ve smyslu rovnováhy mezi růstem a diferenciací. Rostliny trpící krátkodobě nedostatkem dusíku upřednostnily růst kořenového systému nad růstem nadzemní části, což se projevilo nejmenší plochou nadzemní části u N-deficientních rostlin intenzivním růstem hlavního i postranních kořenů. Naopak u rostlin trpících krátkodobým nedostatkem fosforu došlo k postupnému zastavení růstu hlavního kořene i delších kořenů postranních. Naproti tomu dlouhodobý nedostatek fosforu nebo dusíku vedl v obou případech ke snížení rychlosti růstu kořenového systému oproti rostlinám kontrolním. N-deficientní rostliny rostly velmi podobně jako rostliny trpící nedostatkem fosforu.

Změny v morfologii kořenového systému u P-deficientních rostlin a u rostlin trpících dlouhodobě nedostatkem dusíku jsou s velkou pravděpodobností navozeny postupnou terminací aktivity apikálního meristému, současně dochází k diferenciaci pletiv v těsné blízkosti za špičkou kořene.

V případě promotoru *TTL4* lze konstatovat, že čím menší kořenový systém, tím vyšší podíl ploch s aktivitou promotoru. Největší aktivitu vykazoval promotor genu *TTL4* při nedostatku fosforu, bez ohledu na délku deficiencie. Z čehož lze usuzovat, že promotor genu *TTL4* je aktivnější v kořenech pomaleji rostoucích, kde dochází k diferenciaci pletiv blíže ke špičce kořene, což je ve zvýšené míře patrné u P-deficientních rostlin. Závislost na celkové délce je tedy zřejmě slabší než závislost na aktuální rychlosti/intenzitě růstu kořene, neboť u P-deficientních rostlin je hodnota průměrné intenzity modré barvy nižší oproti rostlinám trpícím nedostatkem nitrátu i v případě, že mají srovnatelně velký kořenový systém.

V případě promotoru *TTL3* korelace mezi velikostí kořenového systému a procentuálním zastoupením oblastí kořene s detekovatelnou GUS aktivitou nevykazovala ve všech experimentech shodný trend, ale i zde je promotor genu *TTL3* neaktivnější u rostlin trpících nedostatkem fosforu, jejichž kořenyjevily známky terminace aktivity apikálního meristému.

Rostliny *TTL1::uidA* - linie 83 se výrazně nelišily v růstových parametrech ani v hodnotě velikosti plochy s detekovatelnou aktivitou GUS v závislosti na různých variantách výživy. Rostliny této linie vykazovaly výrazně větší rychlost růstu oproti ostatním liniím, což může souviset s kvalitou semen. Větší biomasa zřejmě způsobila menší citlivost ke krátkodobému přenesení do podmínek deficience.

Závěrem je možné shrnout, že pozorované změny v aktivitě promotorů *TTL3* a *TTL4* souvisí se změnami v intenzitě růstu či míře diferenciaci pletiv a nejsou zapojeny přímo do odpovědi rostlin na dostupnost N či P. Vzhledem k výše popsaným závěrům a vzhledem k tomu, že na udržení rovnováhy mezi proliferací a diferenciací buněk se podílí mimo auxinů a cytokininů i další fytohormony, je pravděpodobné, že pozorované změny v aktivitě promotoru genů TTL rodiny souvisí s jejich zapojením do signálních drah ovlivňujících aktivitu apikálního meristému skrze některý z fytohormonů.

## 7. Použitá literatura

- Abel,S., Ticconi,C.A., and Delatorre,C.A.** (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum* **115**:1-8.
- Al-Ghazi,Y., Muller,B., Pinloche,S., Tranbarger,T.J., Nacry,P., Rossignol,M., Tardieu,F., and Dumas,P.** (2003) Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant Cell and Environment* **26**:1053-1066.
- Anghinoni,I. and Barber,S.A.** (1980) Phosphorus Influx and Growth-Characteristics of Corn Roots As Influenced by Phosphorus Supply. *Agronomy Journal* **72**:685-688.
- Armstrong,J.I., Yuan,S., Dale,J.M., Tanner,V.N., and Theologis,A.** (2004) Identification of inhibitors of auxin transcriptional activation by means of chemical genetics in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:14978-14983.
- Bai,H.W., Murali,B., Barber,K., and Wolverton,C.** (2013) Low Phosphate Alters Lateral Root Setpoint Angle and Gravitropism. *American Journal of Botany* **100**:175-182.
- Bao,F., Shen,J., Brady,S.R., Muday,G.K., Asami,T., and Yang,Z.** (2004) Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**:1624-1631.
- Barlow,P.W.** (1976) Towards An Understanding of Behavior of Root Meristems. *Journal of Theoretical Biology* **57**:433-451.
- Benkova,E. and Bielach,A.** (2010) Lateral root organogenesis - from cell to organ. *Current Opinion in Plant Biology* **13**:677-683.
- Blatch,G.L. and Lassel,M.** (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**:932-939.
- Blilou,I., Xu,J., Wildwater,M., Willemsen,V., Paponov,I., Friml,J., Heidstra,R., Aida,M., Palme,K., and Scheres,B.** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**:39-44.
- Brenner,W.G., Romanov,G.A., Kollmer,I., Burkle,L., and Schmulling,T.** (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant Journal* **44**:314-333.
- Britto,D.T. and Kronzucker,H.J.** (2002)  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* **159**:567-584.
- Brouwer,R.** (1962) Nutritive influences on the distribution of dry matter in the plant. *Neth J Agric Sci* **10**.

- Buchanan,B.B., Wolosiuk,R.A., and Schurmann,P.** (1979) Thioredoxin and Enzyme Regulation. Trends in biochemical sciences **4**:93-96.
- Caba,J.M., Centeno,M.L., Fernandez,B., Gresshoff,P.M., and Ligero,F.** (2000) Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type. Planta **211**:98-104.
- Camacho-Cristobal,J.J., Rexach,J., Conejero,G., Al-Ghazi,Y., Nacry,P., and Dumas,P.** (2008) *PRD*, an *Arabidopsis* AINTEGUMENTA-like gene, is involved in root architectural changes in response to phosphate starvation. Planta **228**:511-522.
- Celenza,J.L., Grisafi,P.L., and Fink,G.R.** (1995) A Pathway for Lateral Root-Formation in *Arabidopsis Thaliana*. Genes & Development **9**:2131-2142.
- Ceserani,T., Trofka,A., Gandotra,N., and Nelson,T.** (2009) VH1/BRL2 receptor-like kinase interacts with vascular-specific adaptor proteins VIT and VIK to influence leaf venation. Plant Journal **57**:1000-1014.
- Chacán-López,A., Ibarra-Laclette,E., Sánchez-Calderón,L., Gutiérrez-Alanís,D., and Herrera-Estrella,L.** (2011) Global expression pattern comparison between *low phosphorus insensitive 4* and WT *Arabidopsis* reveals an important role of reactive oxygen species and jasmonic acid in the root tip response to phosphate starvation. Plant signaling & behavior **6**:382-392.
- Chevalier,F., Pata,M., Nacry,P., Dumas,P., and Rossignol,M.** (2003) Effects of phosphate availability on the root system architecture: large-scale analysis of the natural variation between *Arabidopsis* accessions. Plant Cell and Environment **26**:1839-1850.
- Chung,Y., Maharjan,P.M., Lee,O., Fujioka,S., Jang,S., Kim,B., Takatsuto,S., Tsujimoto,M., Kim,H., and Cho,S.** (2011) Auxin stimulates DWARF4 expression and brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis*. The Plant Journal **66**:564-578.
- Clouse,S.D. and Sasse,J.M.** (1998) Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **49**:427-451.
- D'Andrea,L.D. and Regan,L.** (2003) TPR proteins: the versatile helix. Trends in biochemical sciences **28**:655-662.
- Das,A.K., Cohen,P.T.W., and Barford,D.** (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. Embo Journal **17**:1192-1199.
- De Bolle,M.F.C., Butaye,K.M.J., Coucke,W.J.W., Goderis,I.J.W.M., Wouters,P.F.J., van Boxel,N., Broekaert,W.F., and Cammue,B.P.A.** (2003) Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. Plant Science **165**:169-179.
- Dello Ioio,R., Linhares,F.S., Scacchi,E., Casamitjana-Martinez,E., Heidstra,R., Costantino,P., and Sabatini,S.** (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. Current Biology **17**:678-682.

- Dello Ioio,R., Nakamura,K., Moubayidin,L., Perilli,S., Taniguchi,M., Morita,M.T., Aoyama,T., Costantino,P., and Sabatini,S.** (2008) A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* **322**:1380-1384.
- Devaiah,B.N., Madhuvanthi,R., Karthikeyan,A.S., and Raghothama,K.G.** (2009) Phosphate Starvation Responses and Gibberellic Acid Biosynthesis Are Regulated by the MYB62 Transcription Factor in *Arabidopsis*. *Molecular plant* **2**:43-58.
- Dharmasiri,S., Swarup,R., Mockaitis,K., Dharmasiri,N., Singh,S.K., Kowalchuk,M., Marchant,A., Mills,S., Sandberg,G., Bennett,M.J., and Estelle,M.** (2006) AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science* **312**:1218-1220.
- Drew,M.C.** (1975) Comparison of Effects of A Localized Supply of Phosphate, Nitrate, Ammonium and Potassium on Growth of Seminal Root System, and Shoot, in Barley. *New Phytologist* **75**:479-490.
- Drew,M.C., Saker,L.R., and Ashley,T.W.** (1973) Nutrient Supply and Growth of Seminal Root System in Barley .1. Effect of Nitrate Concentration on Growth of Axes and Laterals. *Journal of Experimental Botany* **24**:1189-1202.
- Edgar R, Domrachev M Lash AE.** (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository.
- Evans,M.L., Ishikawa,H., and Estelle,M.A.** (1994) Responses of *Arabidopsis* Roots to Auxin Studied with High Temporal Resolution - Comparison of Wild-Type and Auxin-Response Mutants. *Planta* **194**:215-222.
- Forde,B.G.** (2002) Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology* **53**:203-224.
- Forde,B.G. and Walch-Liu,P.** (2009) Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant Cell and Environment* **32**:682-693.
- Freijssen,A.H.J. and Otten,H.** (1984) The Effect of Nitrate Concentration in A Flowing Solution System on Growth and Nitrate Uptake of 2 Plantago Species. *Plant and Soil* **77**:159-169.
- Gelvin,S.B. and Kim,S.I.** (2007) Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1769**:410-421.
- Gonzalez-Garcia,M.P., Vilarrasa-Blasi,J., Zhiponova,M., Divol,F., Mora-Garcia,S., Russinova,E., and Cano-Delgado,A.I.** (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. *Development* **138**:849-859.
- Greenboim-Wainberg,Y., Maymon,I., Borochoy,R., Alvarez,J., Olszewski,N., Ori,N., Eshed,Y., and Weiss,D.** (2005) Cross talk between gibberellin and cytokinin: the *Arabidopsis* GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *The Plant Cell Online* **17**:92-102.

**Guo,F.Q., Wang,R.C., and Crawford,N.M.** (2002) The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1 (CHL1)* is regulated by auxin in both shoots and roots. *Journal of Experimental Botany* **53**:835-844.

**Hacham,Y., Holland,N., Butterfield,C., Ubeda-Tomas,S., Bennett,M.J., Chory,J., and Savaldi-Goldstein,S.** (2011) Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* **138**:839-848.

**Hilgert Delgado A.** Function of *TTL* Gene Family and Their Effect on Lateral Root Formation in *Arabidopsis*. 2011. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy na katedře experimentální biologie rostlin.

**Hirano,T., Kinoshita,N., Morikawa,K., and Yanagida,M.** (1990) Snap Helix with Knob and Hole - Essential Repeats in S-Pombe Nuclear-Protein Nuc2+. *Cell* **60**:319-328.

**Hobbie,L. and Estelle,M.** (1995) The *Axr4* Auxin-Resistant Mutants of *Arabidopsis-Thaliana* Define A Gene Important for Root Gravitropism and Lateral Root Initiation. *Plant Journal* **7**:211-220.

**Horgan,J.M. and Wareing,P.F.** (1980) Cytokinins and the Growth-Responses of Seedlings of *Betula-Pendula* Roth and *Acer-Pseudoplatanus* l to Nitrogen and Phosphorus Deficiency. *Journal of Experimental Botany* **31**:525-532.

**Ibanes,M., Fabregas,N., Chory,J., and Cano-Delgado,A.I.** (2009) Brassinosteroid signaling and auxin transport are required to establish the periodic pattern of *Arabidopsis* shoot vascular bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:13630-13635.

**Ikram,S., Bedu,M., Daniel-Vedele,F., Chaillou,S., and Chardon,F.** (2012) Natural variation of *Arabidopsis* response to nitrogen availability. *Journal of Experimental Botany* **63**:91-105.

**Jiang,C.F., Gao,X.H., Liao,L., Harberd,N.P., and Fu,X.D.** (2007) Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*(1[OA]). *Plant Physiology* **145**:1460-1470.

**Kiba,T., Kudo,T., Kojima,M., and Sakakibara,H.** (2011) Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **62**:1399-1409.

**Kiba,T., Yamashino,T., Naito,T., Koizumi,N., Sakakibara,H., and Mizuno,T.** (2005) Combinatorial microarray analysis revealing *arabidopsis* genes implicated in cytokinin responses through the His-to-Asp phosphorelay circuitry. *Plant and Cell Physiology* **46**:S48.

**Kolbe,A., Oliver,S.N., Fernie,A.R., Stitt,M., van Dongen,J.T., and Geigenberger,P.** (2006) Combined transcript and metabolite profiling of *Arabidopsis* leaves reveals fundamental effects of the thiol-disulfide status on plant metabolism. *Plant Physiology* **141**:412-422.

**Krouk,G., Lacombe,B., Bielach,A., Perrine-Walker,F., Malinska,K., Mounier,E., Hoyerova,K., Tillard,P., Leon,S., Ljung,K., Zazimalova,E., Benkova,E., Nacry,P., and**



- Gojon,A.** (2010) Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell* **18**:927-937.
- Lai,F., Thacker,J., Li,Y.Y., and Doerner,P.** (2007) Cell division activity determines the magnitude of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **50**:545-556.
- Lakhssassi,N., Doblas,V.G., Rosado,A., del Valle,A.E., Pose,D., Jimenez,A.J., Castillo,A.G., Valpuesta,V., Borsani,O., and Botella,M.A.** (2012) The *Arabidopsis* Tetratricopeptide Thioredoxin-Like Gene Family Is Required for Osmotic Stress Tolerance and Male Sporogenesis. *Plant Physiology* **158**:1252-1266.
- Lam,H.M., Chiu,J., Hsieh,M.H., Meisel,L., Oliveira,I.C., Shin,M., and Coruzzi,G.** (1998) Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* **396**:125-126.
- Lardet,L., Leclercq,J., Benistan,E., Dessailly,F., Oliver,G., Martin,F., and Montoro,P.** (2011) Variation in GUS activity in vegetatively propagated *Hevea brasiliensis* transgenic plants. *Plant Cell Reports* **30**:1847-1856.
- Li,L., Xu,J., Xu,Z.H., and Xue,H.W.** (2005) Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**:2738-2753.
- Li,Q., Li,B.H., Kronzucker,H.J., and Shi,W.M.** (2010) Root growth inhibition by  $\text{NH}_4^+$  in *Arabidopsis* is mediated by the root tip and is linked to  $\text{NH}_4^+$  efflux and GMPase activity. *Plant Cell and Environment* **33**:1529-1542.
- Li,Z.X., Xu,C.Z., Li,K.P., Yan,S., Qu,X., and Zhang,J.R.** (2012) Phosphate starvation of maize inhibits lateral root formation and alters gene expression in the lateral root primordium zone. *Bmc Plant Biology* **12**.
- Lima,J.E., Kojima,S., Takahashi,H., and von Wiren,N.** (2010) Ammonium Triggers Lateral Root Branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-Dependent Manner. *Plant Cell* **22**:3621-3633.
- Linkohr,B.I., Williamson,L.C., Fitter,A.H., and Leyser,H.M.O.** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **29**:751-760.
- Liu,T.Y., Chang,C.Y., and Chiou,T.J.** (2009) The long-distance signaling of mineral macronutrients. *Current opinion in plant biology* **12**:312-319.
- Lopez-Bucio,J., Cruz-Ramirez,A., and Herrera-Estrella,L.** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:280-287.
- Lopez-Bucio,J., Hernandez-Abreu,E., Sanchez-Calderon,L., Nieto-Jacobo,M.F., Simpson,J., and Herrera-Estrella,L.** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* **129**:244-256.
- Malamy,J.E.** (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell and Environment* **28**:67-77.

- Malamy,J.E. and Ryan,K.S.** (2001) Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**:899-909.
- Martin,A.C., del Pozo,J.C., Iglesias,J., Rubio,V., Solano,R., de la Pena,A., Leyva,A., and Paz-Ares,J.** (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **24**:559-567.
- Matzke,A.J.M. and Matzke,M.A.** (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current opinion in plant biology* **1**:142-148.
- Miller,A.J. and Cramer,M.D.** (2005) Root nitrogen acquisition and assimilation. In *Root Physiology: from Gene to Function*, Springer), pp. 1-36.
- Mollier,A. and Pellerin,S.** (1999) Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany* **50**:487-497.
- Moriyama,Y. and Yamamoto,A.** (2004) Glutamatergic chemical transmission: Look! here, there, and anywhere. *Journal of Biochemistry* **135**:155-163.
- Moubayidin,L., Di Mambro,R., and Sabatini,S.** (2009) Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* **14**:557-562.
- Moubayidin,L., Perilli,S., Dello Ioio,R., Di Mambro,R., Costantino,P., and Sabatini,S.** (2010) The Rate of Cell Differentiation Controls the *Arabidopsis* Root Meristem Growth Phase. *Current Biology* **20**:1138-1142.
- Murashige,T.S.F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plant* **15**:473-497.
- Mussig,C., Shin,G.H., and Altmann,T.** (2003) Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**:1261-1271.
- Nacry,P., Canivenc,G., Muller,B., Azmi,A., Van Onckelen,H., Rossignol,M., and Dumas,P.** (2005) A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**:2061-2074.
- Nagpal,P., Ellis,C.M., Weber,H., Ploense,S.E., Barkawi,L.S., Guilfoyle,T.J., Hagen,G., Alonso,J.M., Cohen,J.D., and Farmer,E.E.** (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**:4107-4118.
- Nemhauser,J.L., Mockler,T.C., and Chory,J.** (2004) Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plos Biology* **2**:1460-1471.
- Nole-Wilson,S., Tranby,T.L., and Krizek,B.A.** (2005) AINTEGUMENTA-like (*AIL*) genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. *Plant Molecular Biology* **57**:613-628.
- Paul,M.J. and Stitt,M.** (1993) Effects of Nitrogen and Phosphorus Deficiencies An Levels of Carbohydrates, Respiratory Enzymes and Metabolites in Seedlings of Tobacco and Their Response to Exogenous Sucrose. *Plant Cell and Environment* **16**:1047-1057.

**Peret,B., Clement,M., Nussaume,L., and Desnos,T.** (2011) Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science* **16**:442-450.

**Perez-Torres,C.A., Lopez-Bucio,J., Cruz-Ramirez,A., Ibarra-Laclette,E., Dharmasiri,S., Estelle,M., and Herrera-Estrella,L.** (2008) Phosphate Availability Alters Lateral Root Development in *Arabidopsis* by Modulating Auxin Sensitivity via a Mechanism Involving the TIR1 Auxin Receptor. *Plant Cell* **20**:3258-3272.

**Perilli,S., Moubayidin,L., and Sabatini,S.** (2010) The molecular basis of cytokinin function. *Current opinion in plant biology* **13**:21-26.

**Prasad,B.D., Goel,S., and Krishna,P.** (2010) In silico identification of carboxylate clamp type tetratricopeptide repeat proteins in *Arabidopsis* and rice as putative co-chaperones of Hsp90/Hsp70. *PLoS One* **5**:e12761.

**Raper,C.D., Parsons,L.R., Patterson,D.T., and Kramer,P.J.** (1977) Relationship Between Growth and Nitrogen Accumulation for Vegetative Cotton and Soybean Plants. *Botanical Gazette* **138**:129-137.

**Remans,T., Nacry,P., Pervent,M., Filleur,S., Diatloff,E., Mounier,E., Tillard,P., Forde,B.G., and Gojon,A.** (2006a) The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:19206-19211.

**Remans,T., Nacry,P., Pervent,M., Girin,T., Tillard,P., Lepetit,M., and Gojon,A.** (2006b) A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**:909-921.

**Rider,S.D., Henderson,J.T., Jerome,R.E., Edenberg,H.J., Romero-Severson,J., and Ogas,J.** (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **35**:33-43.

**Rosado,A., Schapire,A.L., Bressan,R.A., Harfouche,A.L., Hasegawa,P.M., Valpuesta,V., and Botella,M.A.** (2006) The *Arabidopsis* tetratricopeptide repeat-containing protein TTL1 is required for osmotic stress responses and abscisic acid sensitivity. *Plant Physiology* **142**:1113-1126.

**Roycewicz,P. and Malamy,J.E.** (2012) Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**:1489-1500.

**Ruffel,S., Krouk,G., Ristova,D., Shasha,D., Birnbaum,K.D., and Coruzzi,G.M.** (2011) Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:18524-18529.

**Rufty,T.W., Raper,C.D., and Huber,S.C.** (1984) Alterations in Internal Partitioning of Carbon in Soybean Plants in Response to Nitrogen Stress. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **62**:501-508.

**Sabatini,S., Beis,D., Wolkenfelt,H., Murfett,J., Guilfoyle,T., Malamy,J., Benfey,P., Leyser,O., Bechtold,N., Weisbeek,P., and Scheres,B.** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**:463-472.

**Sakakibara,H.** (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *ANNUAL REVIEW OF PLANT BIOLOGY*

**Salama,A.M.S.E. and Wareing,P.F.** (1979) Effects of Mineral-Nutrition on Endogenous Cytokinins in Plants of Sunflower (*Helianthus-Annuus L*). *Journal of Experimental Botany* **30**:971-981.

**Sanchez-Calderon,L., Lopez-Bucio,J., Chacon-Lopez,A., Cruz-Ramirez,A., Nieto-Jacobo,F., Dubrovsky,J.G., and Herrera-Estrella,L.** (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **46**:174-184.

**Sanchez-Calderon,L., Lopez-Bucio,J., Chacon-Lopez,A., Gutierrez-Ortega,A., Hernandez-Abreu,E., and Herrera-Estrella,L.** (2006) Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiology* **140**:879-889.

**Scheible,W.R., Lauerer,M., Schulze,E.D., Caboche,M., and Stitt,M.** (1997) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal* **11**:671-691.

**Schubert,D., Lechtenberg,B., Forsbach,A., Gils,M., Bahadur,S., and Schmidt,R.** (2004) Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: The predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* **16**:2561-2572.

**Sefrnova , Y., Delgado, A. H., Fischer, L., Cvrckova, F., Dubrovsky, J. G., and Soukup, A.** (2011) Tetratricopeptide-repeat thioredoxin-like genes and their role in lateral root development in *Arabidopsis*. 7th International Symposium on Structure and Function of Roots. Book of abstracts: 173

**Signora,L., De Smet,I., Foyer,C.H., and Zhang,H.M.** (2001) ABA plays a central role in mediating them regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **28**:655-662.

**Sikorski,R.S., Boguski,M.S., Goebel,M., and Hieter,P.** (1990) A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* **60**:307-317.

**Soukup, A., Sefrnova , Y., Delgado, A. H., Cvrckova, F., Fischer, L., Vielle Calzada , J. P., and Dubrovsky, J. G.** (2012) *TTL* genes in lateral root growth and development. ISSR Symposium. Book of abstracts: 62

**Stepanova,A.N., Yun,J., Likhacheva,A.V., and Alonso,J.M.** (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **19**:2169-2185.

- Svistoonoff,S., Creff,A., Reymond,M., Sigoillot-Claude,C., Ricaud,L., Blanchet,A., Nussaume,L., and Desnos,T.** (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* **39**:792-796.
- Taniguchi,M., Sasaki,N., Tsuge,T., Aoyama,T., and Oka,A.** (2007) ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant and Cell Physiology* **48**:263-277.
- Teale,W.D., Paponov,I.A., and Palme,K.** (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**:847-859.
- Ticconi,C.A., Lucero,R.D., Sakhonwasee,S., Adamson,A.W., Creff,A., Nussaume,L., Desnos,T., and Abel,S.** (2009) ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:14174-14179.
- Vanneste,S., De Rybel,B., Beemster,G.T., Ljung,K., De Smet,I., Van Isterdael,G., Naudts,M., Iida,R., Gruissem,W., and Tasaka,M.** (2005) Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online* **17**:3035-3050.
- Vert,G., Walcher,C.L., Chory,J., and Nemhauser,J.L.** (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:9829-9834.
- Vidal,E.A. and Gutiérrez,R.A.** (2008) A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Current opinion in plant biology* **11**:521-529.
- Walch-Liu,P. and Forde,B.G.** (2008) Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant Journal* **54**:820-828.
- Walch-Liu,P., Ivanov,I.I., Filleur,S., Gan,Y.B., Remans,T., and Forde,B.G.** (2006a) Nitrogen regulation of root branching. *Annals of Botany* **97**:875-881.
- Walch-Liu,P., Liu,L.H., Remans,T., Tester,M., and Forde,B.G.** (2006b) Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**:1045-1057.
- Wang,R., Okamoto,M., Xing,X., and Crawford,N.M.** (2003) Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology* **132**:556-567.
- Ward,J.T., Lahner,B., Yakubova,E., Salt,D.E., and Raghothama,K.G.** (2008) The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiology* **147**:1181-1191.
- Williamson,L.C., Ribrioux,S.P.C.P., Fitter,A.H., and Leyser,H.M.O.** (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**:875-882.

- Woodward,A.W. and Bartel,B.** (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**:707-735.
- Yamaguchi-Shinozaki,K. and Shinozaki,K.** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu.Rev.Plant Biol.* **57**:781-803.
- Yang,X.J. and Finnegan,P.M.** (2010) Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Annals of Botany* **105**:513-526.
- Yokoyama,A., Yamashino,T., Amano,Y.I., Tajima,Y., Imamura,A., Sakakibara,H., and Mizuno,T.** (2007) Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **48**:84-96.
- Yoshida,H., Nagata,M., Saito,K., Wang,K.L., and Ecker,J.R.** (2005) *Arabidopsis* ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *Bmc Plant Biology* **5**:14.
- Zhang,H., Rider,S.D., Henderson,J.T., Fountain,M., Chuang,K., Kandachar,V., Simons,A., Edenberg,H.J., Romero-Severson,J., Muir,W.M., and Ogas,J.** (2008) The CHD3 remodeler PICKLE promotes trimethylation of histone H3 lysine 27. *Journal of Biological Chemistry* **283**:22637-22648.
- Zhang,H.M. and Forde,B.G.** (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**:407-409.
- Zhang,H.M., Jennings,A., Barlow,P.W., and Forde,B.G.** (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:6529-6534.
- Zhang,H.M., Rong,H.L., and Pilbeam,D.** (2007) Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **58**:2329-2338.